

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I
(Nutrición)



**Comportamiento de aceite de girasol y oleína de palma en
frituras de patatas: estudio *in vitro* de la actividad hidrolítica
de la lipasa pancreática porcina sobre sustratos
termooxidados**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ruth Arroyo Pérez

Directores

Francisco José Sánchez Muñiz

José M^a Sánchez-Montero

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA. I. (NUTRICIÓN)**

**COMPORTAMIENTO DE ACEITE DE GIRASOL Y
OLEÍNA DE PALMA EN FRITURAS DE PATATAS.
ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
HIDROLÍTICA DE LA LIPASA PANCREÁTICA
PORCINA SOBRE SUSTRATOS TERMOOXIDADOS**

**RUTH ARROYO PÉREZ
Madrid, 1995**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA. I. (NUTRICIÓN)
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA (CSIC-UCM)
DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

COMPORTAMIENTO DE ACEITE DE GIRASOL Y
OLEÍNA DE PALMA EN FRITURAS DE PATATAS.
ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
HIDROLÍTICA DE LA LIPASA PANCREÁTICA
PORCINA SOBRE SUSTRATOS TERMOOXIDADOS

RUTH ARROYO PÉREZ
Madrid, 1995

Memoria presentada por Ruth Arroyo Pérez, aspirante al Grado de Doctor en Farmacia


"COMPORTAMIENTO DE ACEITE DE GIRASOL Y OLEÍNA DE PALMA EN FRITURAS DE PATATAS. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA LIPASA PANCREÁTICA PORCINA SOBRE SUSTRATOS TERMOOXIDADOS"



Edo.: Ruth Arroyo Pérez

Aspirante al Grado de Doctor en Farmacia

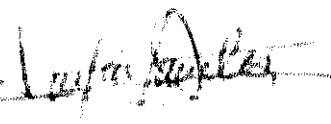
Directores,



Edo.: C. Cuesta Lorenzo



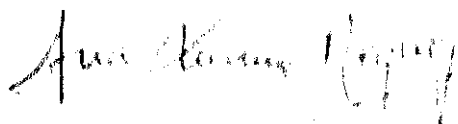
Edo.: F. J. Sánchez-Muniz



Edo.: J. M. Sánchez Montero

V^ªB^a Directora del

Dpto. Nutrición y Bromatología I,



Edo.: A.M. Requejo Marcos

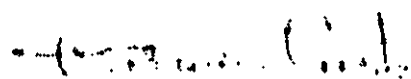
CARMEN CUESTA LORENZO, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, FRANCISCO JOSÉ SÁNCHEZ MUNIZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN) DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y JOSÉ MARÍA SÁNCHEZ MONTERO, AYUDANTE DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, COMO DIRECTORES DE LA PRESENTE MEMORIA,

C E R T I F I C A N

Que el presente trabajo de investigación titulado "Comportamiento de aceite de girasol y oleína de palma en frituras de patatas. Estudio *in vitro* de la actividad hidrolítica de la lipasa pancreática porcina sobre sustratos termooxidados", que constituye la Memoria que presenta D^a Ruth Arroyo Pérez para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en los siguientes laboratorios

- Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid
- Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC-UCM)
- Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

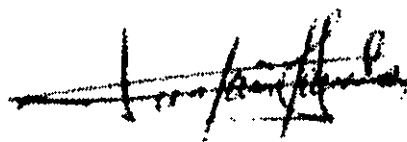
Y para que conste, firman la presente certificación en Madrid a seis de Marzo de mil novecientos noventa y cinco



Fdo. C. Cuesta Lorenzo



Fdo. F. J. Sánchez Muñoz



Fdo. J. M. Sánchez Montero

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO
DE
QUÍMICA ORGÁNICA
Y FARMACÉUTICA
M A D R I D

Esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en:

- Departamento de Nutrición y Bromatología I. Facultad de Farmacia. U.C.M.**
- Centro Mixto: Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC-U.C.M.)**
- Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. U.C.M.**

y financiado por:

- Proyecto de la Comisión Asesora de Ciencia y Tecnología ALE 92-0289-CO2-01, titulado: "Efectos de dietas que contienen aceites con alto contenido en oleico, no usados o usados en fritura sobre la ingesta, digestibilidad, metabolismo lipídico y trombogénesis"**
- Beca personal del Ministerio de Educación y Ciencia.**

Desco expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. D. Carmen Cuesta Lorenzo, al Dr. D. Francisco José Sánchez Muñoz y al Dr. D. José María Sánchez Montero por su inestimable eficacia en la dirección de esta Tesis Doctoral. Así como, por el interés, apoyo, dedicación y amistad prestados en todo momento.

A la Dra. D. Ana María Requero Marcos, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) por haberme permitido realizar este trabajo en dicho Departamento.

A la Dra. D. Carmen Avendaño, Directora del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, por las facilidades dadas en el uso de sus laboratorios.

Al Dr. D. José Vicente Smisterna por la ayuda prestada y el interés demostrado a lo largo del trabajo.

Al Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC) de Sevilla y en especial a las Dras D. Carmen Dolarganes y D. Carmen Pérez Camino, por permitirme trabajar en su laboratorio aprendiendo la técnica de HPLC, y por su desinteresada ayuda y colaboración.

Al Dr. D. Francisco J. Burguillos, del Departamento de Química Física de la Universidad de Salamanca, por permitirme utilizar el paquete estadístico SIMFIT y por su ayuda y asesoramiento.

A D. Laura Barrios, Jefe del Dpto. de Estadística del Centro Técnico de Informática CTE-CSIC, por su asesoramiento y realización de algunos aspectos del estudio estadístico el estudio estadístico.

A AGRA S.A. por la cesión de la oleína de palma de palma utilizada en este estudio.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una beca personal para la realización de esta Tesis.

Deseo, asimismo, expresar mi agradecimiento personal:

A María Aguirre, por ayudarme siempre que la necesite, sus consejos, su paciencia y sobre todo, por ser una buena amiga.

A Sara Lopez Varela y Carmen Garrido por la ayuda prestada, por su amistad y por los buenos momentos compartidos.

A Esther, Ana Pérez, Antonio, Beatriz, Pablo y Sara Bastida por su amistad, ánimo y ayuda cuando la necesité.

Isabel Orvay, Ana Castrillón, Elena, M^a Jose, M^a Rosa y M^a Luz por la gran ayuda que me han prestado siempre que las he necesitado.

A todos mis compañeros del Departamento con los que he trabajado a lo largo de este tiempo, por ayudarme siempre que los necesité.

A mis compañeros del laboratorio de Química Orgánica, especialmente al Dr. Andrés Alcántara, por los buenos ratos compartidos en el laboratorio y por la gran ayuda que me prestaron siempre que lo necesité.

A Jesús Alonso por prestarme su ordenador para escribir esta Tesis, por su amistad y apoyo.

A Carmen Alonso, por su buena amistad, su ánimo y sobre todo, sus buenos consejos.

A mis familia, por el apoyo y la ayuda que me han prestado en todo momento y por su paciencia.

Quisiera hacer una mención especial en este apartado de agradecimientos personales al Dr. José María Sánchez Montero, en primer lugar, por transmitirme su ilusión y entusiasmo por este trabajo, por su tenacidad, por todo lo que he aprendido de él y sobre todo, por ser un buen amigo.

A mi familia

INDICE

I.- INTRODUCCION

11 - LA FRITURA DE LOS ALIMENTOS VARIABLES QUE INFLUYEN EN ESTE PROCESO CULINARIO	2
11 - Variables dependientes del aceite o grasa de fritura	4
111 - Propiedades de las grasas culinarias	5
1111 - Aceite de girasol	7
1112 - Aceite de palma	9
112 - Cambios producidos en las grasas culinarias durante la fritura	12
1121 - Alteraciones hidrolíticas	15
1122 - Alteraciones oxidativas	15
11221 - Monómeros oxidados	18
112211 - Autooxidación	18
112212 - Fotooxidación	20
112213 - Autooxidación de los triglicéridos	21
11222 - Polimerización oxidativa	22
11223 - Componentes volátiles	24
1123 - Alteraciones térmicas	27
11231 - Formación de monómeros cíclicos	27
11232 - Polimerización térmica	28
11233 - Reacciones termolíticas	29
113 - Calidad de los aceites de fritura	31
1131 - Aditivos en los aceites	34
12 - Variables dependientes del alimento	38
121 - Preparación	38
122 - Intercambio de grasa entre los alimentos y el medio de fritura	39
123 - Cantidad de la grasa absorbida por los alimentos	41
13 - Variables dependientes del proceso	43
131 - Temperatura	43
132 - Tiempo y tipo de calentamiento	44
133 - Relación superficie-volumen	44
134 - Relación aceite-alimento	45

1.3.5 - Adición de aceite nuevo	45
1.3.6 - Filtración	46
1.3.7 - Material de la vasija	46
1.3.8 - Equipos de fritura	47
1.3.8.1 - Tipos de freidoras	47
1.3.8.1.1 - Discontinuas	47
1.3.8.1.2 - Continuas	48
 12 - EVALUACION ANALITICA DE LA ALTERACION DE LOS ACEITES DE FRITURA	50
2.1 - Indices analiticos de caracter general	50
2.2 - Evaluacion de la alteracion total	52
2.3 - Cuantificación de los compuestos específicos de la alteracion	56
 13 - LIPASA PANCREATICA	59
3.1 - Digestion de las grasas dietarias	59
3.2 - Lipasas	61
3.2.1 - Definición	61
3.2.2 - Clasificación de las lipasas	63
3.3 - Emulsiones	64
3.3.1 - Formacion de la emulsion	64
3.3.2 - Estabilidad de las emulsiones	67
3.4 - Estructura de la lipasa pancreática	67
3.4.1 - Estructura primaria	67
3.4.2 - Estructura secundaria	71
3.5 - Mecanismo de la lipolisis	73
3.5.1 - Adsorción interfacial	74
3.5.2 - Activación interfacial	76
3.5.3 - Catálisis	78
3.6 - Relacion mecanismo de acción-estructura de la proteína	79
3.6.1 - Modificaciones químicas del centro activo	79
3.6.2 - Estudios tridimensionales de las lipasas	81
3.6.3 - Mecanismo de la reacción	82

3.7 - Especificidad de sustratos	85
3.8 - Moduladores de la lipólisis	87
3.9 - Medida de la actividad lipásica	91
3.9.1 - Sustratos	91
3.9.2 - Condiciones	92
3.10 - Métodos de determinación de actividad lipásica	93
3.10.1 - Métodos titrimétricos	93
3.10.2 - Métodos turbidimétricos	94
3.10.3 - Métodos espectrofotométricos	94
3.10.4 - Cromatografía gaseosa	95
3.10.5 - Otros métodos	95
II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	96
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	99
III.1 - FRITURA DE PATATAS EN ACEITE DE GIRASOL. ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN PRODUCIDA EN DICHO ACEITE UTILIZANDO DOS MODALIDADES DIFERENTES DE FRITURA	100
1.1 - Diseño experimental. Condiciones de fritura	100
1.1.1 - Fritura con recambio frecuente de aceite	100
1.1.2 - Fritura sin recambio de aceite	102
1.2 - Recogida y preparación de los aceites	104
1.3 - Análisis de los aceites. Medida de la alteración	104
1.3.1 - Índices físico-químicos de carácter general	104
1.3.1.1 - Índice de refracción	104
1.3.1.2 - Determinación de la acidez libre	105
1.3.2 - Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total	106
1.3.2.1 - Determinación de la composición porcentual en ácidos grasos	106
1.3.2.1.1 - Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos	106

1.3.2.1.2 - Analisis de los esterios metilicos mediante cromatografia gaseosa	107
1.3.2.2 - Determinacion cuantitativa de los triglicéridos no polares y de compuestos polares del aceite	108
1.3.3 - Metodos analiticos que cuantifican los compuestos especificos de la alteracion	110
1.3.3.1 - Determinación de los productos de la alteración termo-oxidativa e hidrolitica	110
1.3.3.2 - Estudio de los factores de respuesta de los diferentes compuestos de los aceites	111
1.4 - Tratamiento estadístico	117
 III.2 - FRITURA DE PATATAS EN OLEINA DE PALMA ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA DESPUES DE SUCEsIVAS FRITURAS SIN RENOVACION DE ACEITE	119
2.1 - Diseño experimental Condiciones de fritura	119
2.2 - Recogida y preparacion de los aceites	122
2.3 - Analisis de los aceites Medida de la alteracion	122
2.3.1 - Indices analiticos de caracter general	122
2.3.1.1 - Indice de refracción	122
2.3.1.2 - Determinacion de la acidez libre	123
2.3.1.3 - Prueba colorimetrica de Perevalov modificada	123
2.3.2 - Metodos analiticos para la evaluacion de la alteracion total	124
2.3.2.1 - Determinación cuantitativa de los triglicéridos no alterados y de compuestos polares del aceite	124
2.3.2.2 - Determinación de los restos acilo alterados y no alterados	124
2.3.2.2.1 - Preparacion de los esterios metilicos de los acidos grasos	124
2.3.2.2.2 - Separación de los esterios metilicos alterados de los no alterados	125
2.3.2.2.3 - Determinación de la composicion en ácidos grasos de los aceites	126

2.3.3 - Metodos analiticos que cuantifican los compuestos especificos de la alteracion	126
2.3.3.1 - Determinacion de los productos de la alteracion termooxidativa e hidrolitica	126
2.3.3.1.1 - Estudio del factor de respuesta de los componentes polares de la oleina de palma	127
2.4 - Tratamiento estadistico	128
III.3 - LIPASA PANCREATICA <i>IN VITRO</i> ESTUDIO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA	131
3.1 - Sustancias patron	131
3.1.1 - Caracterizacion de las sustancias patron	132
3.1.2 - Alteracion de las muestras	137
3.1.3 - Caracterizacion de las muestras termooxidadas	137
3.1.4 - Determinacion de la actividad lipasica	138
3.1.4.1 - Ensayo estandar de actividad enzimatica	140
3.2 - Aceites vegetales	144
3.2.1 - Aceites vegetales, alteración mediante frituras y estudio de la degradacion producida	144
3.2.1.1 - Caracterización del aceite de oliva virgen	145
3.2.1.2 - Oleina de palma y aceite de girasol refinado	145
3.2.2 - Determinacion de la actividad lipasica	145
III.4 - LIPASA PANCREATICA <i>IN VITRO</i> ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA LIPOLISIS	147
4.1 - Sustratos empleados	147
4.2 - Hidrolisis enzimatica	147
4.3 - Estudio estadistico	149
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	
IV.1 - FRITURA DE PATATAS EN ACEITE DE GIRASOL. ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA EN DICHO ACEITE UTILIZANDO DOS MODALIDADES DIFERENTES DE FRITURA	151

1.1 - Variación de la temperatura del aceite durante el proceso de fritura	151
1.2 - Rendimiento	155
1.2.1 - Pérdida de volumen de aceite del baño de fritura	155
1.2.2 - Variación del peso de las patatas	158
1.3 - Índices analíticos de carácter general	160
1.3.1 - Índice de refracción	161
1.3.2 - Índice de acidez	164
1.4 - Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total	168
1.4.1 - Determinación de la composición porcentual en ácidos grasos	168
1.4.2 - Determinación cuantitativa de los triglicéridos no polares y de los compuestos polares del aceite	172
1.5 - Determinación de productos de alteración termooxidativa e hidrolítica	178
1.5.1 - Estudio de los factores de respuesta de los diferentes compuestos de los aceites	178
1.5.2 - Determinación de productos de alteración termooxidativa e hidrolítica en el aceite de girasol	180
1.6 - Correlaciones entre las diferentes determinaciones realizadas	189
 IV.2 - FRITURA DE PATATAS EN OLEINA DE PALMA. ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN PRODUCIDA DESPUÉS DE SUCESIVAS FRITURAS SIN RENOVACIÓN DE ACEITE	 191
2.1 - Variación de la temperatura del aceite durante el proceso de fritura	193
2.2 - Índices analíticos de carácter general	195
2.2.1 - Índice de refracción	195
2.2.2 - Índice de acidez	198
2.2.3 - Prueba colorimétrica de Perevalov modificada	200
2.3 - Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total	202
2.3.1 - Determinación cuantitativa de los triglicéridos no polares y de compuestos polares del aceite	202
2.3.2 - Determinación de los restos aceito alterados y no alterados	204
2.3.3 - Determinación de la composición en ácidos grasos	208

2.4 - Determinación de productos de alteración termooxidativa e hidrolítica	213
2.4.1 - Estudio del factor de respuesta de los componentes polares de la oleína de palma	221
2.5 - Correlaciones entre las diferentes determinaciones realizadas	221
2.6 - Análisis factorial en componentes principales	224
IV.3 - LIPASA PANCREÁTICA <i>IN VITRO</i> ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	227
3.1 - Sustancias patrón	227
3.1.1 - Alteración de las muestras	234
3.1.2 - Caracterización de las muestras termooxidadas	234
3.1.2.1 - Composición en ácidos grasos	234
3.1.2.2 - Determinación de los compuestos polares	236
3.1.2.3 - Análisis de productos específicos de la alteración	239
3.1.2.4 - Espectro de absorción UV-visible y medida de absorbancia a 232 nm	245
3.2 - Estudio cinético de la hidrólisis de sustancias patrón y aceites vegetales con diferente grado de termooxidación	258
3.2.1 - Hidrólisis de sustratos modelo	258
3.2.1.1 - Aceite de oliva emulsionado (Sigma)	258
3.2.1.2 - Trioleína y 1,3 dioleína	262
3.2.2 - Hidrólisis de aceites de origen vegetal	272
3.2.2.1 - Oleína de palma	272
3.2.2.2 - Triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP)	287
3.2.2.3 - Aceite de girasol	293
3.2.2.4 - Aceite de oliva virgen	298
3.3 - Discusión conjunta	300
3.3.1 - Muestras sin alterar	300
3.3.2 - Muestras calentadas	304

IV.4 - LIPASA PANCREATICA <i>IN VITRO</i> ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA LIPOSIS	307
4.1 - Hidrolisis enzimatica de sustratos no alterados	307
4.2 - Hidrolisis enzimatica de oleina de palma utilizada en frituras sucesivas de patatas	311
4.3 - Hidrolisis enzimatica de la fraccion polar de la oleina de palma utilizada en diferentes frituras de patatas	316
4.4 - Analisis factorial en componentes principales	321
4.4.1 - Sustratos no alterados	322
4.4.2 - Oleina de palma con diferente grado de alteración	323
4.4.3 - Fraccion polar de la oleina de palma con diferente grado de alteracion	324
V.- CONCLUSIONES	327
VI.- BIBLIOGRAFIA	332

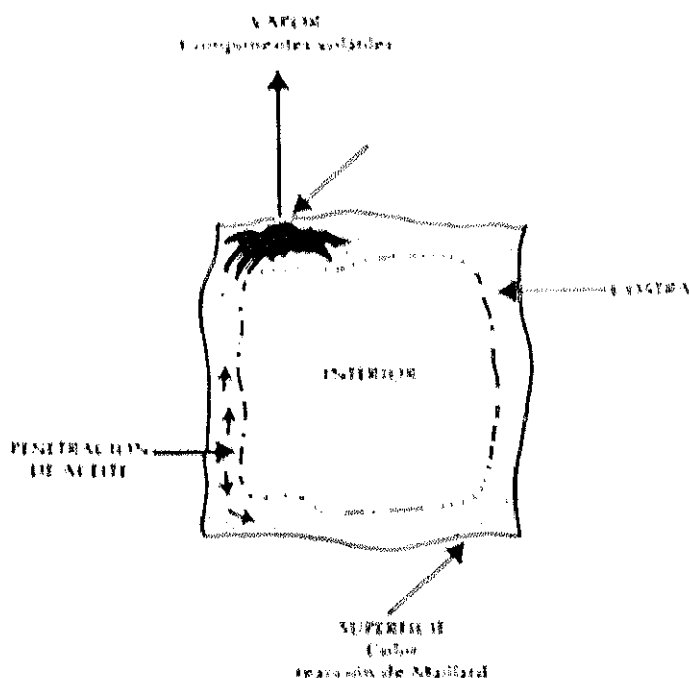
I.- INTRODUCCIÓN

1.1 LA FRITURA DE LOS ALIMENTOS. VARIABLES QUE INFLUYEN EN ESTE PROCESO CULINARIO.

La fritura es un procedimiento culinario que consiste en la introducción del alimento en el seno de un aceite caliente, el cual actúa como medio transmisor del calor (Permanyer y Boatella, 1977).

Esta forma de cocinar es más eficaz que el calor seco de un horno y más rápida que hervir en agua caliente. Esto es debido a que, durante la fritura, se produce una mayor penetración del calor dentro del producto que se está cocinando, lo que proporciona a los alimentos fritos una estructura determinada (Robertson, 1967). Dicha estructura es básicamente la siguiente (figura 1):

Figura 1.- Estructura del alimento frito e intercambios entre el alimento y el medio.



- Zona superficial. Es la parte más externa del alimento frito que se caracteriza por poseer un color pardo dorado que le proporciona un aspecto muy agradable (Stevenson y col., 1984). Su color característico se debe a la "reacción de pardamiento no enzimático" o "reacción de Maillard", la cual tiene lugar cuando los azúcares y las proteínas presentes en el producto reaccionan en presencia de calor (Kaanane y Labuza, 1989). Estas mismas

Introducción

reacciones originan los sabores deseados en los productos fritos. La intensidad del color desarrollado depende fundamentalmente del tiempo y la temperatura de fritura, así como de la composición de dichos alimentos, mientras que el tipo de grasa empleada no es tan decisivo.

- Zona externa o "corteza". Se forma por la deshidratación de las zonas del exterior del alimento que tiene lugar durante el proceso de fritura. El medio graso reemplaza parcialmente el agua perdida por evaporación (Guillaumin, 1988). Dicha "costra", al formarse, evita que se desprenda el vapor rápidamente, facilitando así la cocción del interior del alimento y permitiendo que quede más jugoso (Monferrer y Villalta, 1993b). Esta "corteza" es la responsable de la gran palatabilidad y aceptación de los alimentos fritos.

- Zona interna. Es el núcleo central mayoritario del alimento frito que se cocina gracias al calor que penetra en dicho alimento procedente del aceite caliente. Los cambios de aroma y textura originados en dicha zona se deben más al efecto del calor sobre el alimento que a la absorción de grasa (Stevenson y col., 1984).

Durante la fritura de los alimentos, se producen tanto fenómenos de transferencia de masa como de transferencia de calor:

- Transferencia de masa. El agua del alimento que se está friendo (deshidratando) migra radialmente de la porción central hacia afuera, hacia las paredes y los bordes, para reemplazar el agua que se pierde por deshidratación de las superficies exteriores (Blumenthal, 1991). Además de éste, también existen otros fenómenos de transferencia de masa cuantitativamente más pequeños como son: la absorción de aceite por el alimento y la salida del mismo de compuestos solubles en agua.

- Transferencia de calor. El agua desempeña varios papeles en la transferencia de calor hacia el alimento. Por un lado, quita energía térmica del aceite caliente que rodea al alimento que se está friendo. Esta eliminación de energía de la superficie del alimento evita que éste se pegue o carbonice por exceso de deshidratación. Aunque el aceite esté a 180°C, la temperatura del alimento se mantiene a \approx 100°C, temperatura de evaporación del agua.

El agua que está por debajo de la superficie también conduce energía calorífica desde las superficies que tocan el aceite caliente hacia el interior del alimento (el agua es mejor conductor del calor que las porciones grasas, proteicas y de carbohidratos del alimento).

El propósito final es cocinar la parte interna del alimento que se fríe (Blumenthal, 1991). Cuando se trata de patatas fritas, esto significa gelatinizar el almidón del interior. Se debe transferir suficiente calor (energía térmica) para hacer que el agua comience a expandir el almidón, pero no tanta como para deshidratar dicho gel de almidón, lo que produciría la destrucción de su estructura interna.

Al introducir un alimento en aceite caliente para freirlo tienen lugar una serie de procesos y reacciones que producen cambios importantes, tanto en el medio de fritura como en el producto a freír. Estos cambios dependen de factores tales como el tipo, características y calidad del aceite y del alimento a freír, la temperatura y el tiempo de fritura y las características del proceso de producción.

Los cambios que se producen en el alimento durante el proceso de fritura son (Cuesta y Sánchez-Muniz, 1994; Varela y col., 1988):

- Modificación de su textura: los productos se vuelven crujientes y más agradables por su textura y sonido al ser mordidos.
- Mejora su presentación: da a los alimentos un color dorado uniforme y brillante.
- Potencia y matiza sabores y aromas: debido al propio aceite o al desarrollo de nuevos compuestos después de someterse el alimento a altas temperaturas.
- Varía el contenido en grasa del producto: en general, los productos pierden humedad y ganan grasa; si bien algunos alimentos muy ricos en grasa pueden perder parte de ésta durante el proceso de fritura.
- Se prolonga la conservación del producto debido a la destrucción de microorganismos y enzimas presentes en los alimentos.

1.1.1 VARIABLES DEPENDIENTES DEL ACEITE O GRASA DE FRITURA.

Los términos "aceite" o "grasa" son tan sólo un matiz referente al punto de fusión del producto lipídico utilizado para freír, denominándose "aceite" al producto graso líquido a temperatura ambiente y "grasa" al producto graso sólido a temperatura ambiente. Debido a

Introducción

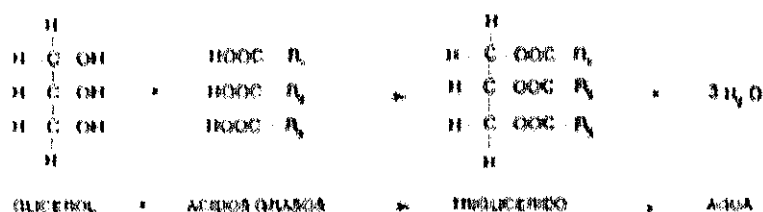
la ambigüedad que representa la variable "temperatura ambiente", nos podemos encontrar con una misma sustancia que sea "aceite" en un país tropical y "grasa" en un país nórdico. En esta Memoria se utilizarán ambos términos indistintamente.

La función del aceite en la fritura es doble. Por un lado, actúa como medio transmisor de calor y, por otro, llega a ser un ingrediente del producto frito al ser absorbido por el mismo. Esta última función tiene especial interés, ya que la estabilidad del aceite y su grado de alteración influirán directamente en la calidad y duración del producto frito (Monferrer y Villalta, 1993a).

1.1.1.1 Propiedades de las grasas culinarias.

La composición química y las constantes físicas y físico-químicas de las grasas culinarias son variables que hay que tener en cuenta en la fritura de los alimentos (Cuesta y Sánchez-Muniz, 1991).

Las grasas están formadas fundamentalmente por triglicéridos, es decir, por una molécula de glicerol esterificada con tres ácidos grasos.



Además, en las grasas también pueden encontrarse, en menor proporción, glicéridos parciales como diglicéridos y monoglicéridos, ácidos grasos libres y una serie de componentes minoritarios que forman la denominada fracción insaponificable y que incluye tocoferoles, esteroides, colorantes, etc. Dichos compuestos pueden actuar como aceleradores o inhibidores de la alteración que sufren los aceites durante la fritura (Huang y col., 1981; Sims y col., 1972).

En la tabla A aparecen los componentes minoritarios de algunos aceites vegetales de uso muy común.

Tabla A.- Componentes menores de algunos aceites (*).

Componente	Oliva Virgen (ppm)	Oliva Refinado (ppm)	Cacahuete (ppm)	Maíz (ppm)	Gitasol (ppm)
Hydrocarburos	20000	1200	100	1000	800
Escualeno	15000	1500	100	15	10
β -Carotenos	600	1200	5	-	20
Tocoferoles	1500	1000	350	450	5000
Fenoles y sust. relacionadas	150	800	-	-	-
Esteres y aromas	1000	60	5	5	-
Aldehídos y cetonas	400	100	5	5	-
Alcoholes de ácidos grasos	2000	1000	1500	2500	1500
Alcoholes terpenícos	35000	25000	20000	20000	15000
Esteroles	25000	15000	15000	15000	10000
Ácidos grasos libres	500	1000	-	-	-

(*) Tomado de Fedeli (1988).

El punto de fusión de la grasa viene determinado por las características de sus ácidos grasos tales como su grado de saturación y su longitud de cadena.

El grado de saturación viene dado por el número de dobles enlaces del ácido graso. A mayor número de ácidos grasos con dobles enlaces, menor punto de fusión de la grasa y mayor facilidad de alteración de la misma (Cuesta y Sánchez-Muniz, 1991), ya que los hidrógenos cercanos a los dobles enlaces tienen más tendencia a reaccionar químicamente que los hidrógenos de enlaces saturados. Se ha descrito (Frankel y col., 1985a) que la velocidad de autooxidación de tres ácidos grasos constituyentes de las grasas, como el oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), es proporcional a 1:40:50:100 en lo referente a la absorción de oxígeno y a 1:12:25 en cuanto al desarrollo de hidroperóxidos.

Introducción

La longitud de cadena se corresponde con el número de átomos de carbono que componen la cadena del ácido graso (normalmente es un número par). A mayor número de átomos de carbono, mayor punto de fusión de la grasa.

A continuación, se describen las características de las grasas culinarias estudiadas en la presente Memoria y que son fundamentalmente el aceite de girasol y la olefina de palma.

1.1.1.1.1 ACEITE DE GIRASOL.

El aceite de girasol se extrae de las semillas de *Helianthus annuus*, de la familia Asteráceas. Se obtiene por presión de las semillas descascarilladas y secas o por extracción con disolventes.

Según El-Shattory y Taha, (1980), la composición en ácidos grasos del aceite de girasol varía según proceda de la variedad descascarillada o de la variedad blanca. Así mismo, la composición en ácidos grasos varía ligeramente cuando estas semillas son calentadas con calor seco. Estos cambios se detallan en la tabla B.

Tabla B.- Composición porcentual de los principales ácidos grasos de la semilla de *Helianthus annuus* obtenidos por calentamiento seco. Composición según variedad (*).

Ácidos grasos	Variedad descascarillada		Variedad blanca	
	Control	Calentamiento seco	Control	Calentamiento seco
C16:0 (%)	7,0	7,2	6,2	6,0
C18:0 (%)	3,2	3,0	2,6	2,4
C18:1 (%)	34,3	33,5	52,1	52,5
C18:2 (%)	55,6	56,3	39,1	39,1

(*) Adaptado de El-Shattory y Taha (1980).

Introducción

La composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios del aceite de girasol, descrita por diferentes autores, aparece en la tabla C:

Tabla C.- Composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios del aceite de girasol.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
Harwood y Geyer (1975)	5,6	trazas	2,2	21,5	66,2
Guillaumin y col., (1978)	6,3	0,1	5,2	18,2	67,3
Figueroa (1984)	7,0	0,1	5,2	23,4	64,4
Garrido-Polonio (1991)	7,1	trazas	4,0	31,1	55,6

Put y col., (citado por El-Shattory Taha, 1980) señalan que el aceite de girasol es rico en ácidos grasos poliinsaturados y debe contener entre 65-75% de ácido linoleico, con sólo trazas de linolénico (0,1 - 0,3%). Estos mismos autores puntualizan que el aceite de girasol cuando se calienta puede sufrir polimerizaciones y sugieren que su reutilización debe ser limitada cuando se frien patatas y otros alimentos.

Según Paccalin y Juliet (1982) el aceite de girasol, prácticamente desprovisto de ácido linolénico, es el más consumido a pesar de su gran labilidad frente al calor. Los mismos autores señalan que, como todos los aceites insaturados, es preferible no calentarlos a más de 180°C, ni usarlo en frituras repetidas más de 8 o 10 veces.

1.1.1.1.2 ACEITE DE PALMA.

El aceite de palma se extrae del fruto de la palma *Elaeis guineensis* (Cottrell, 1991) y ha sido utilizado con fines comestibles desde hace aproximadamente 5000 años (MacFarlane y col., 1984).

Producción de aceite:

Los racimos del fruto se cosechan cuando están maduros y se transportan inmediatamente a la planta extractora. Después de esterilizarlos, con objeto de detener la descomposición enzimática (Berger, 1983), el fruto se separa del racimo y se lleva al digestor. Posteriormente se extrae el aceite, generalmente con una prensa de tornillo (Maycock, 1987, citado por Cottrell, 1991). El aceite crudo se decanta, luego pasa a la centrifuga, se seca y se filtra. En esta etapa el aceite es una sustancia estable y clara, de color rojo anaranjado, y en muchos países se utiliza directamente para cocinar. Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones, el aceite se refina y se fracciona con el objeto de bajar el nivel de color de los productos (Berger, 1983).

Para la refinación del aceite de palma se utilizan principalmente dos métodos: el método físico que es el más común y el método alcalino que es el más flexible (Young, 1987, citado por Cottrell, 1991). Ambos métodos producen un aceite de color y sabor suaves y de buena estabilidad en condiciones de almacenamiento (Nor Aini y col., 1992).

Fraccionamiento:

Debido a la composición de los ácidos grasos, los triglicéridos del aceite de palma pueden cristalizar en forma fraccionada para producir estearina de alto punto de fusión y oleína de bajo punto de fusión, lo cual amplía el rango de productos comestibles en los cuales se pueden utilizar estas fracciones (Deffense, 1985). El fraccionamiento adicional genera un producto de características intermedias, la fracción media del aceite de palma, y otros aceites especiales como la oleína de punto de fusión muy bajo que se emplea para los aceites de mesa. Algunos componentes menores del aceite se separan de forma desigual entre las fracciones. Por ejemplo, la oleína es rica en tocoferoles y tocotrienoles.

Introducción

Composición:

En la tabla D aparece la composición en ácidos grasos de las fracciones de oleína y estearina de palma comparada con la del aceite de palma.

Tabla D.- Composición porcentual en ácidos grasos del aceite de palma y sus fracciones (*).

Acido graso	Aceite de palma	Oleína de palma	Estearina de palma
12:0	0,0-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
14:0	0,8-1,3	0,9-1,0	1,0-1,3
16:0	43,1-46,3	39,5-40,8	46,5-68,9
16:1	Tr-0,3	Tr-0,2	Tr-0,2
18:0	4,0-5,5	3,9-4,4	4,4-5,5
18:1	36,7-40,8	42,7-43,9	19,9-38,4
18:2	9,4-11,9	10,6-11,4	4,1-9,3
18:3	0,1-0,4	0,0-0,4	0,1-0,2
20:0	0,1-0,4	0,1-0,3	0,1-0,3

(*) Adaptado de MacFarlane y col. (1984).

Como se observa en la tabla D la oleína y la estearina de palma poseen los mismos ácidos grasos mayoritarios que son el palmítico (C16:0), el oleico (C18:1) y el linoleico (C18:2). Sin embargo, la oleína de palma presenta un contenido relativamente más alto de ácidos oleico y linoleico y menos ácido palmítico que la estearina de palma.

Introducción

Un estudio realizado sobre la composición en ácidos grasos del aceite de palma de diferentes países, demostró que estos apenas variaban por su origen geográfico (King y Sibley, 1984). El aceite de palma de Costa de Marfil tiene un contenido de ácido esteárico ligeramente más alto que el que proviene de Malasia, mientras que los aceites de Indonesia tienen unos valores ligeramente más elevados de ácido palmítico.

Otra importante característica del aceite de palma y de sus fracciones es su alto contenido en una serie de componentes minoritarios identificados como carotenoides, tocoterol-tocotrienoles y esterol (Goh y col., 1985). El aceite sin refinar de palma contiene la fuente natural más rica de β -caroteno, el cual tiene una alta actividad como vitamina A (Ooi y col., 1994).

Los tocoterol-tocotrienoles (Vit E) se encuentran en abundancia en los productos derivados del aceite de palma, variando de 600-1000 ppm (Tan y Oh, 1981), contribuyendo los tocotrienoles a un 83% del total. Como es bien sabido los tocoterol-tocotrienoles son unos antioxidantes naturales muy potentes. Los principales esterol del aceite de palma y sus derivados son β -sitosterol, campesterol y estigmasterol.

En el aceite de palma también existen compuestos fenólicos cuya concentración total es < 100 mg/l (Berger, 1987); dichos compuestos son los responsables de que el aceite de palma se oscurezca más rápidamente que otros aceites durante la fritura.

Utilización:

El aceite de palma es uno de los aceites más versátiles y tiene multitud de aplicaciones en el área de la alimentación y en otros campos (Nor Aini y Samsuddin, 1992). Se debe reseñar que el aceite de palma tiene una serie de características técnicas que son importantes para su inclusión en muchos productos alimenticios (Cottrell, 1991). Dichas características son: resistencia a la oxidación (Al-Harbi y Al-Kahtani, 1993), lo que conduce a una prolongada vida útil del aceite; su alto contenido en glicéridos sólidos y su tendencia a cristalizar en pequeños cristales beta prima que lo hacen particularmente apto para fabricar margarinas (deMan y deMan, 1994); y por último, su precio es altamente competitivo.

De las distintas clases de productos que pueden derivarse de dicho aceite, en este estudio, son de particular interés las fracciones obtenidas para fritura como la oleína de palma. El aceite de palma y la oleína tienen una buena estabilidad a la oxidación debido a la presencia de antioxidantes naturales (tocoterol-tocotrienoles) y a la falta de ácido

linolénico (C18:3). Son comparativamente más baratos que otros aceites y producen alimentos fritos de buen sabor y vida útil prolongada (Berger y Law, 1987). No obstante, después de varias frituras adquiere un color marrón rojizo, debido a los componentes fenólicos menores del aceite de palma, si bien, esta coloración no está relacionada necesariamente con el deterioro de la calidad de la grasa (Al-Harbi y Al-Kahtani, 1993).

1.1.1.2 Cambios producidos en las grasas culinarias durante las frituras.

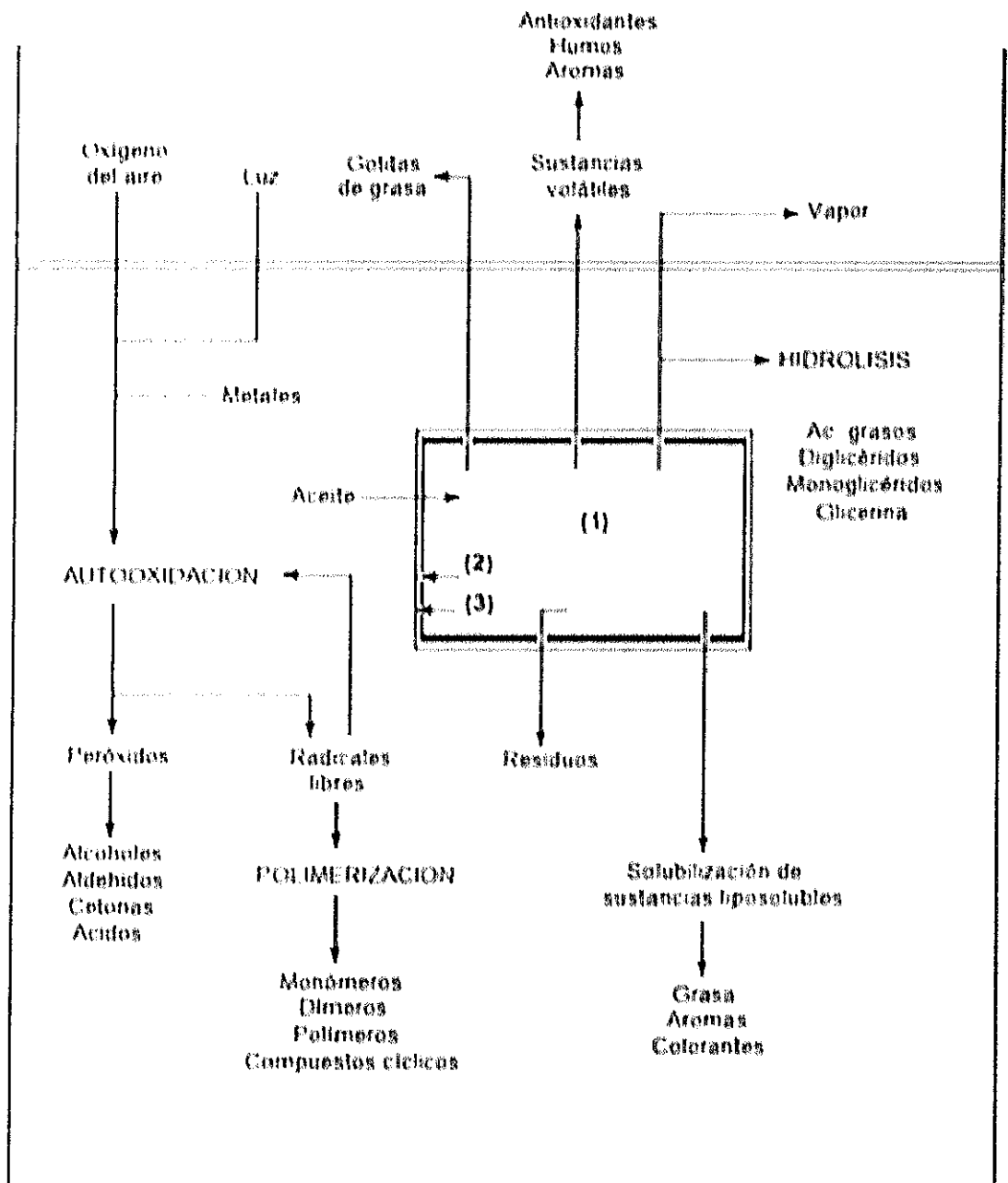
Durante la fritura, la grasa se haya expuesta continua o repetidamente a la acción de varios agentes, los cuales causan cambios en su estructura (Fritsch, 1981; Stevenson y col., 1984). Principalmente se destacan tres agentes: el agua de los alimentos, que es la causa de la alteración hidrolítica; el oxígeno atmosférico que penetra en el aceite desde la superficie de la freidora dando lugar a la alteración oxidativa y, finalmente, la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso (alrededor de 180°C) la cual origina la alteración térmica.

En la figura 2 aparecen representados esquemáticamente los cambios que tienen lugar durante el proceso de fritura, tanto en el aceite, como en el alimento que se fríe. Las modificaciones producidas en el alimento fueron explicadas anteriormente.

En la tabla E se representan las vías principales de alteración de los aceites durante la fritura de los alimentos.

Debe destacarse que estos tres tipos de alteraciones pueden estar no sólo superpuestas, sino también interrelacionadas. Así, la alta temperatura tiene una gran incidencia en los productos de oxidación, favoreciendo la formación de dímeros y polímeros oxidados y no oxidados, y en la misma forma, los ácidos grasos libres originados en la hidrólisis son más susceptibles de sufrir alteración oxidativa y térmica que cuando están esterificados con el glicerol.

Figura 2. PROCESO DE FRITURA*



(1) Interior: Cocción a 100°C, debida a la producción de vapor.

(2) Corteza: En ella disminuye la humedad y aumenta la cantidad de grasa. Sella el producto y evita la pérdida excesiva de vapor.

(3) Exterior: Deshidratación total. Se desarrollan los procesos de caramelización y pardeamiento que dan el color.

* Tomado de Monferrer y Villalta (1993a).

Tabla E.- Rutas principales de la formación de compuestos de alteración en las grasas culinarias (*).

TIPO DE ALTERACION	AGENTE CAUSANTE	COMPUESTOS RESULTANTES
Alteración hidrolítica	Humedad	<ul style="list-style-type: none">• Ácidos grasos• Monoglicéridos• Diglicéridos• Glicerol
Alteración oxidativa	Aire	<ul style="list-style-type: none">• Monómeros oxidados• Dímeros y polímeros oxidados• Dímeros y polímeros• Compuestos volátiles: hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos.
Alteración térmica	Temperatura	<ul style="list-style-type: none">• Monómeros cíclicos• Dímeros y polímeros

(*) Tomado de Gutiérrez-González-Quijano y Dobarganes (1988).

En general, los productos de descomposición de las grasas formados durante la fritura, pueden ser divididos en dos grandes grupos: compuestos volátiles y compuestos no volátiles.

Los componentes volátiles son parcialmente eliminados durante la fritura y su importancia está íntimamente relacionada con las características organolépticas de la grasa y del producto frito. Los componentes no volátiles, por otro lado, son de gran interés desde el punto de vista nutricional, ya que forman parte de la dieta al quedar disueltos en la grasa de fritura y ser por tanto incorporados al alimento frito, y además, desde el punto de vista analítico, porque dichos compuestos se acumulan en el aceite desde el comienzo de la fritura

Introducción

y su nivel está relacionado con la alteración total de la grasa (Fedeli, 1988; Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988).

Paralelas a estas alteraciones básicas hay que considerar las múltiples interacciones que se establecen entre el alimento y la grasa durante la fritura.

1.1.1.2.1 ALTERACIONES HIDROLITICAS.

Este tipo de alteraciones son las primeras que aparecen. Según Dobarganes y col. (1986), la alteración hidrolítica se produce cuando el producto a freír tiene un alto contenido en agua. Los compuestos originados inicialmente son ácidos grasos libres con formación paralela de diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Los triglicéridos que poseen ácidos grasos de cadena corta son más sensibles a la hidrólisis que los que poseen ácidos grasos de cadena larga.

Los procesos de hidrólisis tienen lugar principalmente en el momento de calentar o entrar el aceite ($\leq 100^{\circ}\text{C}$) y durante el almacenamiento del mismo, ya que, durante la fritura, el aceite se encuentra a $180\text{-}185^{\circ}\text{C}$ y a esta temperatura la humedad se elimina en forma de vapor (Monterrer y Villalta, 1993a).

La deshidratación posterior del glicerol da lugar a la acroleína o propenal, de conocido poder tóxico, y los ácidos grasos libres serán el sustrato de posteriores reacciones de oxidación, en las que se originarán hidroperóxidos (Permayner y col., 1985).

1.1.1.2.2 ALTERACIONES OXIDATIVAS.

Las reacciones de oxidación que tienen lugar en los aceites, se producen fundamentalmente a nivel de los dobles enlaces existentes en las cadenas de sus ácidos grasos (Chang y Kummerow, 1953; Stevenson y col., 1984). En la literatura científica hay muchas revisiones sobre la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Chan, 1987; Frankel, 1980, 1985b, 1988, 1991; Gardner, 1989; Grosch, 1987). Como consecuencia de dicha alteración se pueden producir olores desagradables en los aceites vegetales.

Introducción

Aunque existen diferencias sustanciales entre la alteración oxidativa de los lípidos a baja y a alta temperatura, los datos acumulados demuestran que, en ambos casos, la vía principal de obtención de compuestos de alteración, incluye la formación de hidroperóxidos (Frankel, 1985a).

Es bien conocido, que la autooxidación de las grasas tiene lugar a través de un proceso general que consta de tres fases que, según Zhu y Sevilla (1990), explican toda la gama de nuevos compuestos formados y que se resumen a continuación (Figura 3):

Figura 3.- Proceso de autooxidación de las grasas.

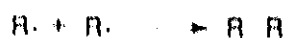
INICIACION:



PROPAGACION:



TERMINACION:



1.- **Iniciación.** En ella se forman los radicales libres ($\text{ROO}\cdot$ y $\text{R}\cdot$), ya sea a partir de un hidroperóxido (ROOH) y favorecido por la alta temperatura y la luz, o a partir de un ácido graso (RH) por encontrarse en el medio metales con facilidad para variar de valencia (Monferrer y Villalta, 1993a).

2.- **Propagación.** Los radicales libres originados en la fase anterior, dada su gran reactividad, reaccionan con el oxígeno atmosférico dando lugar a la formación de peróxidos,

Introducción

los cuales, interaccionan a su vez con nuevas moléculas insaturadas para originar hidroperóxidos.

3.- Terminación. Eliminación de radicales del sistema para formar compuestos estables.

Además, en presencia de la luz, las grasas insaturadas pueden formar hidroperóxidos mediante su reacción con el oxígeno singlete activado mediante fotosensibilización, reacción que no tiene lugar a través de radicales libres (Gollnick, 1978).

Es interesante destacar las principales diferencias que introduce la variable temperatura en el complejo proceso de la oxidación de grasas, por su repercusión en los productos de degradación obtenidos:

i) A bajas temperaturas (hasta 100°C), la velocidad de formación de los hidroperóxidos es mayor que su descomposición, que tiene lugar a través de la vía monomolecular y, por tanto, los compuestos son fundamentalmente monómeros de triglicéridos oxidados.

ii) A elevadas temperaturas (alrededor de 200°C), la velocidad de ramificación de los ROOH a través de la descomposición bimolecular, es mayor que su formación. Los principales compuestos originados son dímeros y polímeros, ya que los radicales con posibilidad de interaccionar son glicéricos (Nawar, 1984).

Por otra parte, al verse aceleradas por el calor todas las reacciones de la cadena autooxidativa, la cantidad de compuestos de alteración obtenidos a temperatura elevada es mucho mayor y su distribución depende del tiempo de calentamiento.

Por ello, el proceso de oxidación de grasas, presenta diferentes posibilidades de formación de radicales y compuestos entre las que destacan dos grupos: monómeros oxidados y compuestos de polimerización.

Un tercer grupo de compuestos, incluye la escisión del resto acilo constituyente del triglicérido, con formación de compuestos volátiles (Frankel, 1982).

Introducción

1.1.1.2.2.1 Monómeros oxidados,

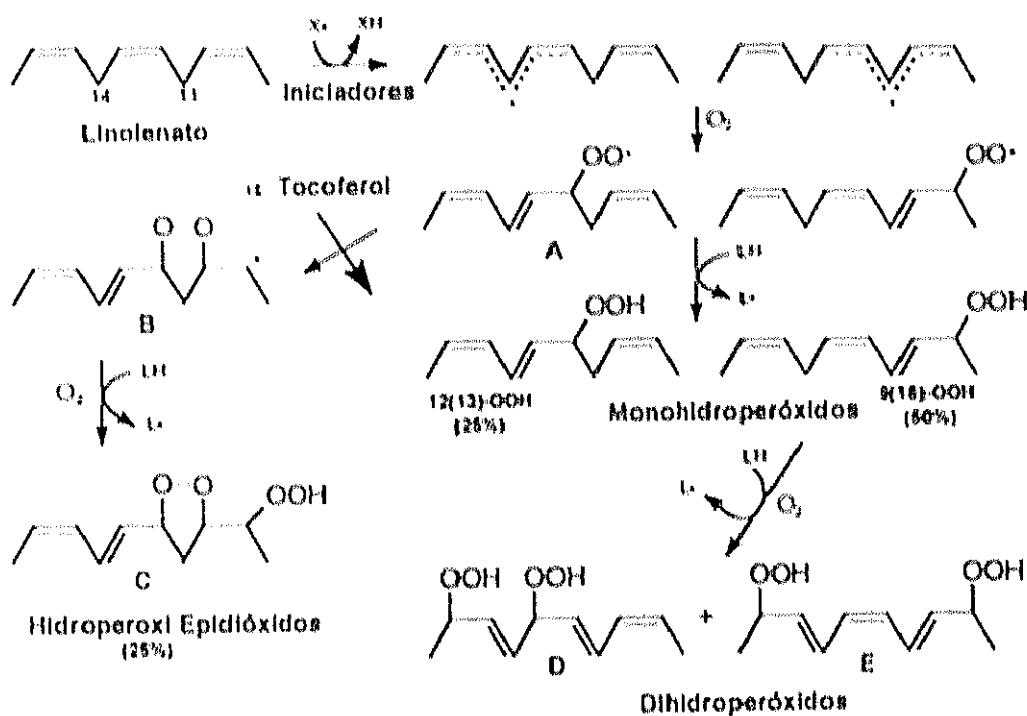
La oxidación de las grasas, como ya se ha dicho antes, tiene lugar mediante la formación de hidroperóxidos, y da lugar a compuestos de estructura muy compleja. Estos compuestos pueden formarse por medio de radicales libres o mediante reacción directa con oxígeno activado (Gollnick, 1978).

1.1.1.2.2.1.1 Autooxidación.

En este caso, los productos alterados se originan tanto mediante reacciones de propagación como de terminación.

Un ejemplo es la autooxidación del linolenato de metilo (Frankel, 1991), que aparece en la figura 4.

Figura 4.- Proceso de autooxidación del linolenato de metilo.



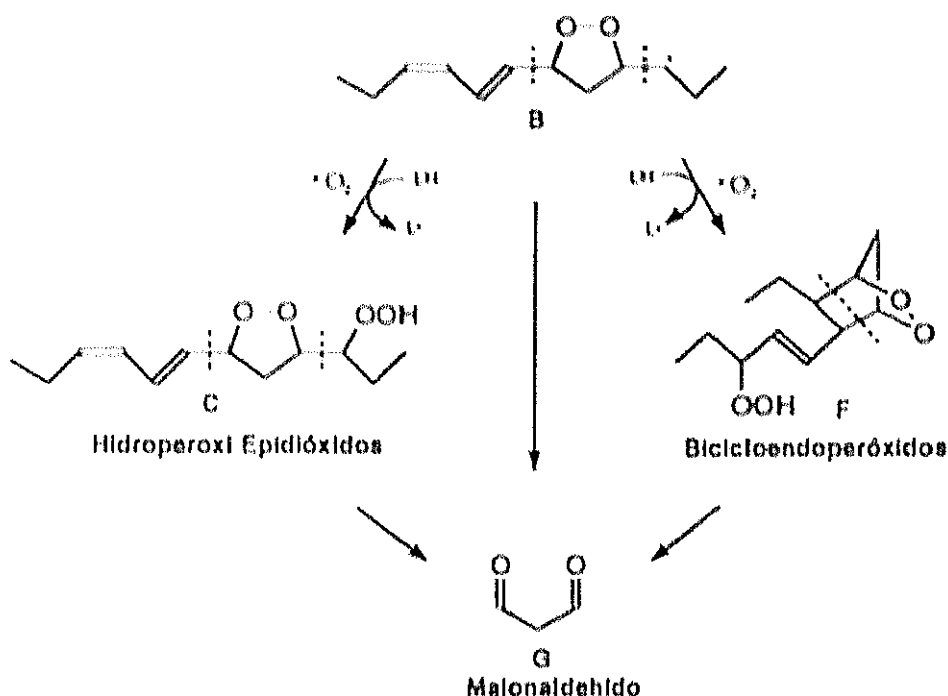
En presencia de iniciadores de radicales libres tales como calor, metales, radiaciones o luz, es transferido un hidrógeno procedente de los dos grupos metileno alílicos activados

Introducción

que se encuentran en posiciones 11 y 14, hacia un aceptor (X^\cdot), formándose dos radicales pentadienilos. La reacción con el oxígeno de los carbonos de la posición final de dichos radicales pentadienilos, produce una mezcla de los cuatro radicales peroxilo correspondientes que conducen a los correspondientes 9-, 12-, 13-, y 16-hidroperóxidos dienóicos conjugados (figura 4). Los hidroperóxidos externos (9- y 16-), se forman en cantidades significativamente mayores que los hidroperóxidos internos (12- y 13-) (Chan y Levett, 1977), debido a que estos últimos sufren una rápida ciclación 1,3 ($A \rightarrow B$) dando lugar a cinco tipos de hidroperoxi epidióxidos (C, figura 4) (Coxon y col., 1981). Peers y col. (1981) observaron que si se añadía un 5% de α -tocoferol como donante de hidrógeno, esta ciclación se inhibía completamente. Una mezcla de dihidroperóxidos (D y E, figura 4) se forma en menores concentraciones que los hidroperoxi epidióxidos, ya que compite con la reacción de ciclación (Neff y col., 1981). Coxon y col. (1984) observaron que en presencia del 10% de α -tocoferol el 9,16-dihidroperóxido (E, figura 4) se formó selectivamente durante la oxidación del linolenato de metilo.

El radical libre intermedio (B, figuras 4 y 5) formado después de la ciclación, puede ciclarse de nuevo y formar bicicloendoperóxidos (F, figura 5), análogos estructurales de las prostaglandinas, o sufrir una ruptura y producir malonaldehído (G, figura 5) lo que origina un valor positivo en el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Pryor y col., 1976).

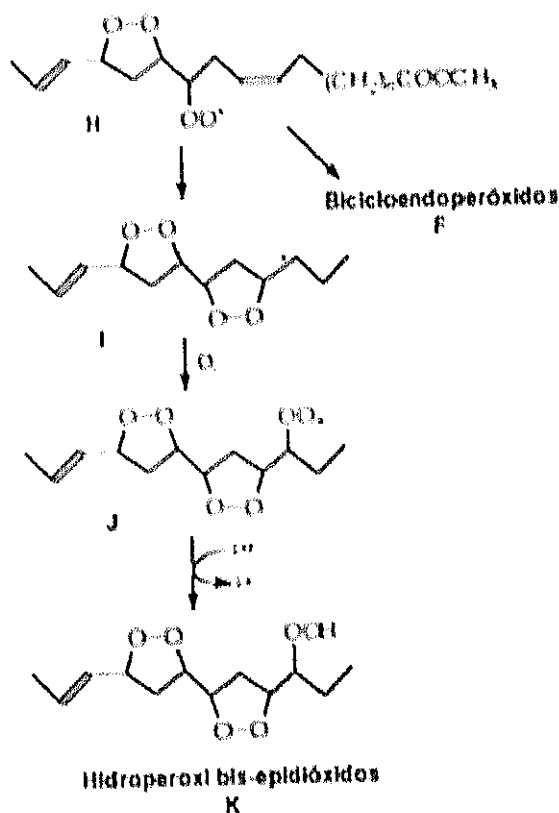
Figura 5.- Proceso de autooxidación del linolenato de metilo (continuación).



1.1.1.2.2.1.2 *Fotooxidación.*

El oxígeno es capaz de excitarse mediante un mecanismo de transferencia de energía desde un agente sensible, como es la clorofila, cuando esta se expone a la luz. Esto hace que el oxígeno pase a un estado singlete activado (Foote, 1968). En dicho estado, el oxígeno puede reaccionar con el linolenato de metilo, al menos 1500 veces más rápido que lo hace el oxígeno normal, para formar hidroperoxidos (Frankel, 1991). La ruptura de los peróxidos originados de esta forma, puede continuar de manera semejante a como ocurre en el caso de los que se originan mediante intermedio de radicales libres.

Figura 6.- Proceso de autooxidación del linolenato de metilo (continuación).



De esta forma, cada doble enlace carbono-carbono de los ácidos grasos reacciona directamente con el oxígeno singlete mediante un mecanismo de adición produciendo hidroperoxidos (Gollnick, 1978). El linolenato de metilo entonces forma seis isómeros: 9-, 10-, 12-, 13-, 15- y 16-hidroperoxidos. En este caso, también los isómeros internos 10-, 12-,

Introducción

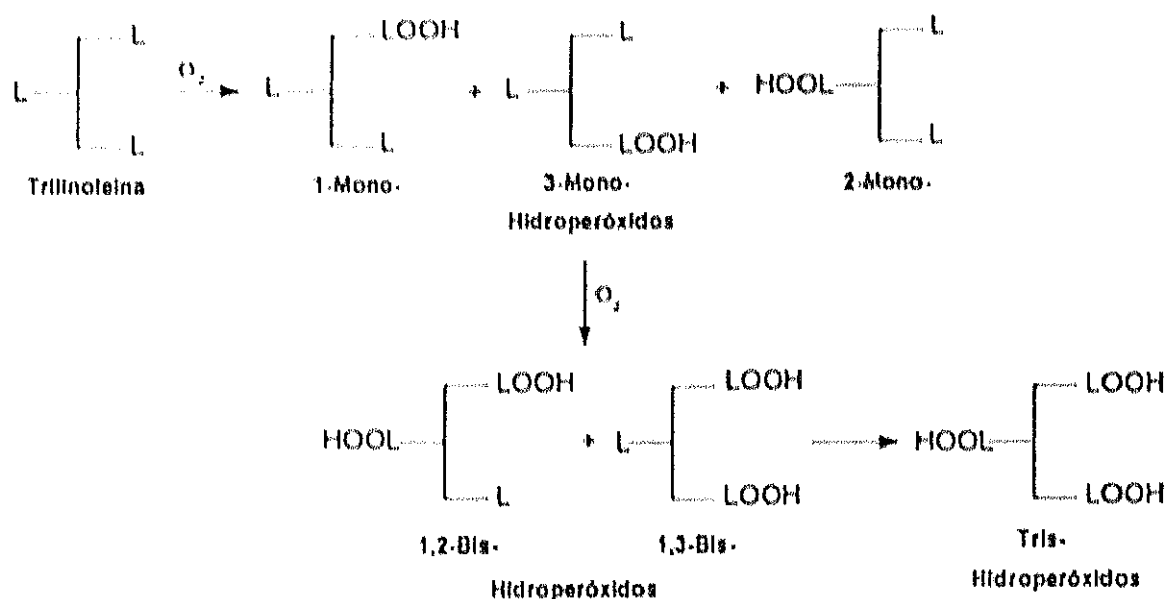
13- y 15- hidroperóxidos fueron encontrados en menor proporción que los externos (9- y 16). Esto es debido a que los radicales peroxi de los hidroperóxidos isoméricos internos, sufren ciclación tanto en el linoleato como en el linolenato de metilo produciendo hidroperoxi-epidioxidos (Coxon y col., 1981). A pesar de que el oxígeno en estado singlete participa en la formación de hidroperóxidos, la ciclación tiene lugar mediante intermediarios de radicales libres (Frankel y col., 1982). En el linolenato de metilo, se producen ciclaciones en serie (H→I) produciendo hidroperoxi-bis-epidioxidos (I→J→K) e hidroperoxi-biciclo-endoperóxidos (F) (Neff y col., 1982) como se puede observar en la figura 6.

1.1.1.2.2.1.3 Autooxidación de los triglicéridos.

La trilinoleína y la trilinolenina se han utilizado como modelo para los estudios de oxidación de los triglicéridos de los aceites vegetales (Frankel y col., 1990; Neff y col., 1990).

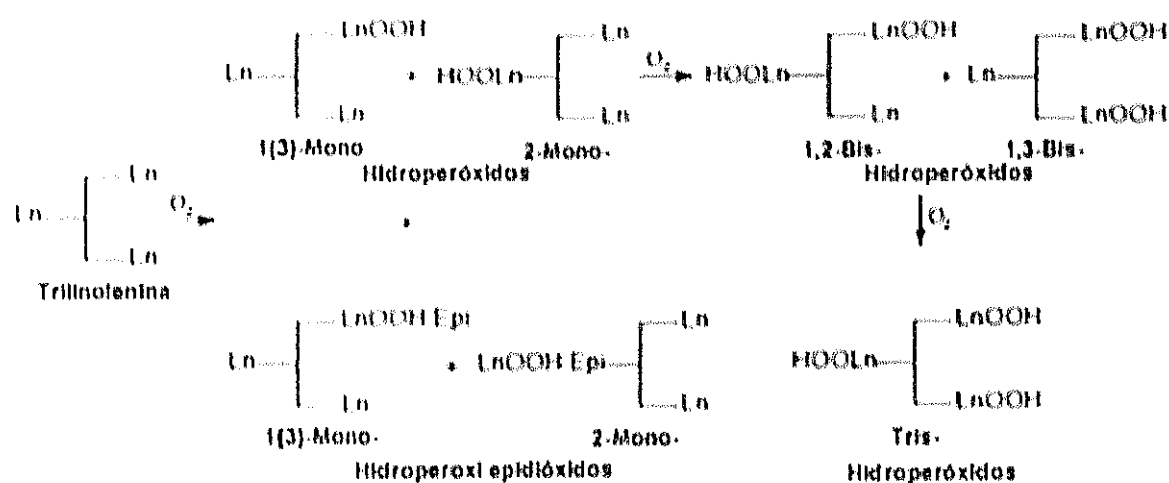
Los productos mayoritarios de la oxidación de la trilinoleína son los mono-, bis- y tris-hidroperóxidos que se forman por adición secuencial de oxígeno, lo que se refleja en la figura 7. Por otro lado, la oxidación de la trilinoleína se produce de forma similar en las diferentes posiciones del triglicérido (1-, 2- y 3-) (Neff y col., 1990).

Figura 7.- Autooxidación de la trilinoleína.



Debido a la autooxidación de la trilinolenina se producen 1(3)- y 2-monohidroperóxidos, 1,3- y 1,2-bis-hidroperóxidos y tris-hidroperóxidos de manera secuencial como se ve en la figura 8 (Frankel y col., 1990). Sin embargo además de los hidroperóxidos, la trilinolenina produce cantidades significativas de hidroperoxiepidióxidos formados mediante ciclación 1,3 (figura 8). En la trilinolenina, la oxidación se produce preferentemente en los dobles enlaces de los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 (Frankel y col., 1990).

Figura 8.- Autooxidación de la trilinolenina.

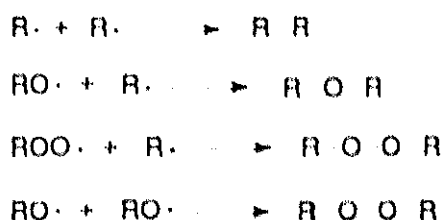


1.1.1.2.2.2 Polimerización oxidativa.

La dimerización, que constituye el primer paso de la polimerización, transcurre a través de cuatro reacciones principales, que dan lugar a dímeros no polares ($\text{C}-\text{C}$), puente éter ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) y puente peróxido ($\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}$), respectivamente, (Frankel, 1985a, 1991) (figura 9).

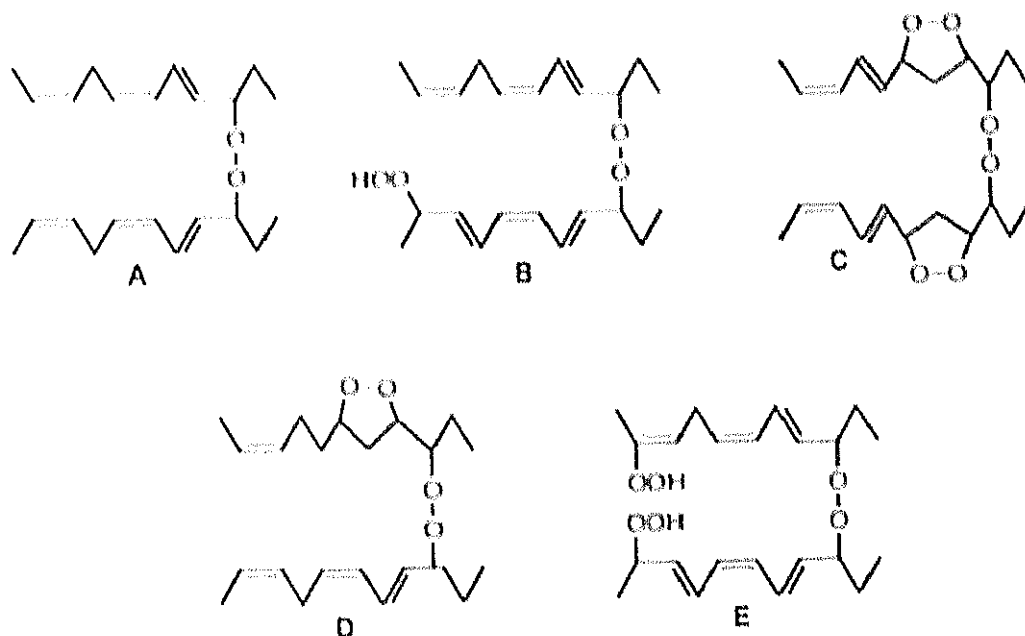
Muchos estudios han sido publicados sobre la naturaleza de los compuestos diméricos y de elevado peso molecular que se producen durante la oxidación de las grasas (Andrich y col., 1994; Christopoulou y Perkins, 1989a, 1989b y 1989c; Firestone, 1963; Gasparoli y col., 1986; Miyashita y col., 1985; Neff y col., 1988).

Figura 9.- Reacciones de dimerización.



Se debe diferenciar entre los dímeros que se forman a temperaturas suaves (40°C) y los formados cuando la temperatura es elevada (>150°C). Durante la oxidación tanto del linoleato como del linolenato de metilo, se producen diferentes tipos de dímeros en función de la temperatura a la que tiene lugar el proceso. De esta manera, cuando la oxidación se produce a 40°C, la unión entre las diferentes moléculas tiene lugar fundamentalmente mediante puentes tipo peróxido (C-O-O-C) (Nell y col., 1988). En la figura 10 se representan las estructuras características de los dímeros producidos durante la autooxidación del linolenato de metilo a 40°C (Nell y col., 1988).

Figura 10.- Polimerización oxidativa del linolenato de metilo. Estructuras características.



Introducción

Por el contrario, los dímeros formados a 150° C presentan exclusivamente uniones tipo éter (C-O-C) y uniones carbono-carbono (C-C) (Frankel, 1991).

La existencia de hidrógenos activos en otros puntos de la molécula, pueden continuar la reacción de polimerización, produciéndose así una mezcla de compuestos de muy diferente polaridad si se tiene en cuenta, además, que las moléculas constituyentes pueden poseer grupos polares en otros puntos de la cadena. Debido a las dificultades analíticas encontradas en el estudio de mezclas complejas de este tipo, la estructura de muchos de los compuestos, así como la influencia de las variables del proceso sobre las diferentes reacciones, permanecen aún pendientes de resolver.

Es importante señalar que aunque los dímeros y polímeros no polares (enlace C-C), se han considerado compuestos característicos de la alteración térmica en condiciones no oxidativas, su formación es también posible a través de la vía oxidativa, siendo una de las clásicas reacciones de eliminación de radicales libres. La importancia de estos compuestos en el conjunto puede ser considerable, sobre todo si existe limitación en la disponibilidad de oxígeno como ocurre en la oxidación no forzada. En estas condiciones, la fase limitante es la propagación, mientras la reacción de iniciación que da lugar a los radicales R·, se encuentra muy acelerada.

1.1.1.2.2.3 Componentes volátiles.

Las reacciones anteriormente citadas, dan lugar a la formación de compuestos de oxidación no volátiles que tienen como mínimo, un peso molecular similar al de la molécula de la que proceden. Un tercer grupo de compuestos en la alteración oxidativa se caracteriza, sin embargo, por su elevada volatilidad y bajo peso molecular.

Los componentes volátiles originados en la oxidación a elevada temperatura, suponen sólo una pequeña parte del total de los compuestos de alteración. No obstante, su extraordinaria importancia desde el punto de vista sensorial, ha contribuido al desarrollo de estudios por parte de los más importantes grupos de trabajo en el campo de las grasas (Chang y col., 1978; Frankel, 1982; Nawar y col., 1978).

Aún cuando no existe acuerdo sobre el término componente volátil, dada la inexistencia de relación entre la volatilidad de los compuestos orgánicos y sus umbrales de

Introducción

detección olfativa, en este apartado consideramos los obtenidos por escisión del resto acilo, es decir, compuestos de menor peso molecular que el del resto acilo del que proceden.

Una excelente revisión realizada por Frankel (1985b), muestra que la composición cualitativa de los componentes volátiles originados, depende frecuentemente de las cadenas grasas insaturadas implicadas y que su esquema de formación se repite, ya sea utilizando como base ácidos grasos, ésteres metílicos, hidroperóxidos o triglicéridos puros.

En síntesis, los componentes volátiles se originan a partir del radical alcóxido, por escisión homolítica a ambos lados del citado radical que produce un aldehído estable. El radical $R\cdot$ o $RO\cdot$ a su vez, dada su labilidad, puede reaccionar con otros radicales en juego para dar lugar a compuestos estables (figura 11):

Figura 11.- Formación de componentes volátiles.



Estas cadenas más cortas de hidroperóxidos pueden iniciar el proceso de formación de compuestos volátiles para originar aldehídos más cortos o, por el contrario, interaccionar con otros radicales originados en el proceso global para incrementar su peso molecular.

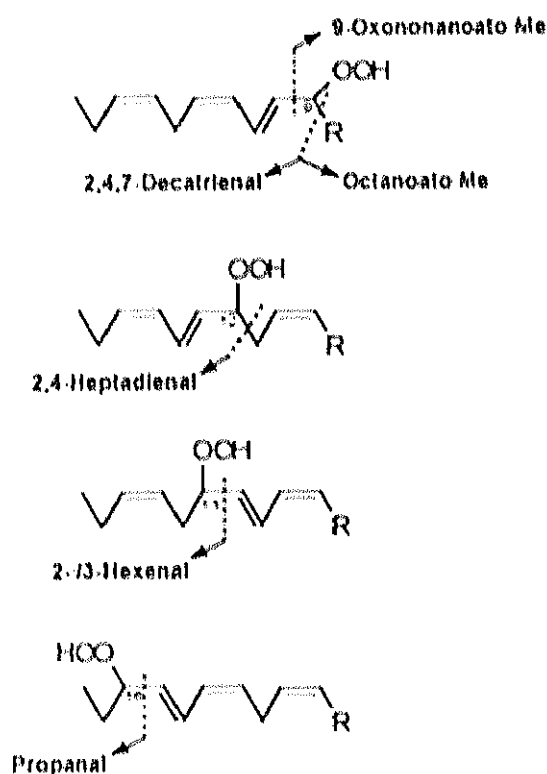
Reacciones similares obtenidas a partir del $R'\cdot$, que porta el grupo carboxilo, darían lugar a ácidos, hidroxiácidos o aldehídos ácidos de cadena corta con compuestos estables cuando se oxidan los ácidos grasos, aunque en el caso concreto de los triglicéridos, $R'\cdot$

Introducción

quedaría unido al glicerol formando parte de una molécula no volátil (Peers y Swoboda, 1979; Selke y Rohwedder, 1983).

Como ejemplo de estos procesos, en la figura 12 se muestran los productos volátiles mayoritarios de la descomposición de los hidroperóxidos del linolenato (Frankel, 1991).

Figura 12.- Productos volátiles mayoritarios de la descomposición de los hidroperóxidos del linolenato.



La influencia de la temperatura en la cantidad de compuestos volátiles originados es enorme, pero la mayor significación de estos compuestos está relacionada con el mecanismo de autooxidación a baja temperatura. En efecto, aunque a baja temperatura la cantidad de compuestos de oxidación total es muy pequeña, la formación de aldehídos y cetonas de umbrales de detección muy bajos, modifica sustancialmente las características organolépticas de la grasa, siendo su principal consecuencia la aparición de rancidez (Robards y col., 1988). A elevada temperatura, sin embargo, la mayor parte de estos compuestos se eliminan del

sistema debido a su volatilidad, y el mayor interés recae en la elevada cantidad de componentes no volátiles originados, cuyas propiedades nutritivas son desconocidas.

En resumen, en una grasa sometida a la acción de la temperatura y del oxígeno, se origina una amplia serie de compuestos volátiles y no volátiles, cuya distribución es difícil predecir y depende fundamentalmente de la insaturación de la grasa, de la continuidad o discontinuidad en el calentamiento y del tiempo de tratamiento (Fritsh y col., 1979; Gere, 1983a y 1983b; Stevenson y col., 1984).

1.1.1.2.3 ALTERACIONES TERMICAS.

Las reacciones térmicas tienen lugar preferentemente en las capas más bajas del recipiente de fritura, dado el menor acceso del aire (Stevenson y col., 1984). Tres grupos de reacciones destacan en la grasa, como consecuencia de la acción de una elevada temperatura en ausencia de oxígeno:

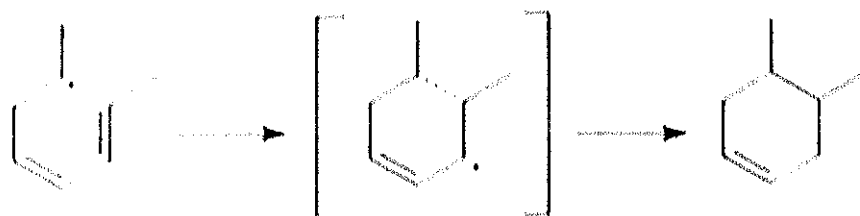
- i) Reestructuración intramolecular con formación de monómeros cíclicos.
- ii) Uniones entre cadenas insaturadas de ácidos grasos que dan lugar a compuestos de polimerización.
- iii) Descomposición termolítica del triglicérido con formación de ácidos grasos, aldehídos y cetonas.

1.1.1.2.3.1 Formación de monómeros cíclicos.

El tratamiento térmico puede conducir a la formación de monómeros cíclicos a partir del linolenato de metilo y del aceite de soja parcialmente hidrogenado, como demostraron Artman y Alexander (1968) y Rojo y Perkins (1987). El mecanismo por el que estos compuestos se originan parece ser que implica la sustracción de un hidrógeno en posición

alífica, seguido de la unión intramolecular del radical libre al doble enlace como se señala en la figura 13:

Figura 13.- Alteración térmica. Proceso de ciclación.



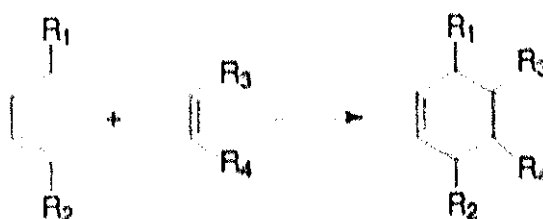
Diferentes autores (Frankel y col., 1984; Gere y col., 1985) han realizado estudios en los que informan de la existencia de monómeros de ácidos grasos cíclicos en grasas y aceites usados para freír industrialmente.

El interés por el estudio de estos compuestos, se relaciona con su toxicidad potencial (Alexander, 1978; Grandgirard y col., 1984), pero su formación sólo es significativa en aceites con elevado contenido en ácido linolénico.

1.1.1.2.3.2 Polimerización térmica.

Los principales compuestos obtenidos en la alteración térmica, son compuestos diméricos en cuya unión no participa el oxígeno, y cuya formación se explica a través de reacciones Diels-Alder, es decir, reacciones entre un doble enlace y un dieno conjugado para formar un derivado ciclohexénico tetrasustituido (figura 14):

Figura 14.- Alteración térmica. Polimerización.



Las reacciones de polimerización que conducen a la formación de estos compuestos, han sido bien estudiadas (Cowan, 1961; Firestone, 1963; Otter, 1970; Leonard, 1975) y exigen la presencia de ácidos grasos poliinsaturados así como su conjugación previa. Una vez formado el dímero, la existencia de dobles enlaces disponibles en otros ácidos grasos de la molécula del triglicérido, puede dar lugar a una posterior reacción, produciendo trimeros que pueden a su vez, continuar la polimerización dando lugar a polímeros muy complejos de alto peso molecular.

Mediante estudios similares que se refieren al ácido oleico, se ha demostrado que la reacción de Diels-Alder, no es el único mecanismo posible en la polimerización térmica (Cowan, 1961). En efecto, la obtención de dímeros se explica por la formación y combinación de radicales alilo, producidos por pérdida de un hidrógeno activo adyacente al doble enlace.

La importancia de estas dos vías depende de la temperatura, de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados y de la existencia de dobles enlaces conjugados.

1.1.1.2.3.3 Reacciones termolíticas,

Dada la importancia mayoritaria de las reacciones que afectan a las cadenas insaturadas en el conjunto de los compuestos originados por vía exclusivamente térmica, la información sobre las reacciones termolíticas se ha obtenido a partir de triglicéridos puros constituidos por ácidos grasos saturados.

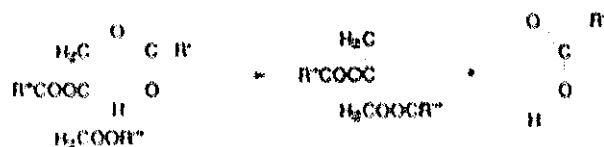
Los productos característicos producidos en el calentamiento de estos triglicéridos, son los siguientes: series de alcanos y 1-alqueno normales, predominando el alcano (C_n-1), ácido graso (C_n), cetonas simétricas (C_{2n-1}), oxopropilésteres (C_n), acroleína, CO y CO₂, siendo n el número de átomos de carbono del ácido graso saturado (Nawar y col., 1978; Nawar, 1985a).

Cuantitativamente, los compuestos mayoritarios son los ácidos grasos libres, producidos por descomposición termolítica del triglicérido (Nawar, 1985b). En un sistema exento de humedad, los ésteres que poseen un hidrógeno β en el componente alcohólico, pueden formar un anillo de seis átomos de carbono, por medio de un puente de hidrógeno.

Introducción

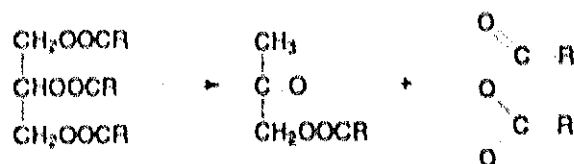
El reajuste de electrones da lugar a un ácido y a una olefina tal como se presenta en la figura 15.

Figura 15. Termolisis.



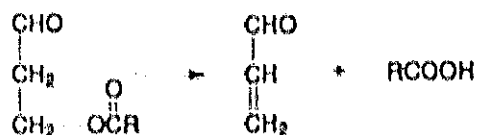
Por otra parte, la eliminación de un anhídrido ácido de la molécula de triglicérido, produce 1 o 2 oxopropilésteres y el anhídrido ácido (figura 16):

Figura 16.- Termolisis (continuación).



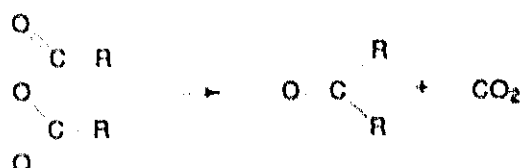
Y de la descomposición de 1 oxopropilésteres se originan acroleína y ácidos grasos (figura 17):

Figura 17.- Termolisis. Formación de acroleína y ácidos grasos libres.



Finalmente, la descarboxilación del anhídrido ácido puede producir una cetona simétrica (figura 18):

Figura 18.- Descarboxilación.



En lo que se refiere a los compuestos volátiles, los más característicos son las series de alcanos y alquenos originados por escisión homolítica C-C a lo largo de la cadena de ácido graso (Nawar, 1985b). Debido a su pequeña proporción en la mezcla total de compuestos de alteración, a la baja significación sensorial de los hidrocarburos y a su eliminación de la grasa por su elevada volatilidad, han sido objeto de menor consideración y no se comentarán de forma más extensa en esta revisión.

1.1.1.3 Calidad de los aceites de fritura.

La aparición de compuestos nuevos como consecuencia de la alteración, origina una serie de cambios físico-químicos en las grasas de fritura (Cuesta y col., 1991b; Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Pérez-Camino y col., 1988b; Sánchez-Muniz y col., 1994) algunos de ellos fácilmente observables y entre los que se destacan:

1.- Variación de las características organolépticas, caracterizada por el desarrollo de olores y sabores típicos de grasas calentadas a altas temperaturas o del tipo de alimentos fritos en ellas.

2.- Incremento de la viscosidad y de la densidad como consecuencia de las reacciones de polimerización.

3.- Oscurecimiento de las grasas atribuido a la presencia en las mismas de compuestos carbonílicos insaturados, o de componentes lipófilos de los alimentos solubilizados en la grasa.

4.- Tendencia de la grasa a formar espuma. Esta propiedad está relacionada con la aparición de polímeros y con la presencia de sustancias anfílicas procedentes de los alimentos.

5.- Incremento de la extinción específica a 232 y 270 nm como consecuencia de la formación de dobles enlaces conjugados y de compuestos carbonílicos α,β insaturados.

6.- Variación de la composición de ácidos grasos, caracterizada por un incremento de los ácidos grasos saturados en relación a los insaturados, los cuales, son más susceptibles de alterarse.

7.- Incremento de la acidez libre del aceite debida fundamentalmente a reacciones de hidrólisis.

8.- Disminución del índice de yodo que tiene lugar a medida que se van eliminando los dobles enlaces en las reacciones de polimerización, ciclación, etc.

9.- Disminución del punto de humo debido a la formación y eliminación de los componentes volátiles.

Conforme se van produciendo estas reacciones, se modifica la calidad funcional, sensorial y nutricional de la grasa, incluso hasta el punto de no poder preparar con ella productos fritos con una calidad deseable, lo que obliga a que dicha grasa deba ser desechada.

Existe una teoría que explica, desde un punto de vista físico-químico, la fritura de los alimentos y el diferente comportamiento de los aceites en la fritura dependiendo de su estado de alteración. Esta es la llamada "teoría surfactante de las frituras" (Blumenthal, 1991), la cual, plantea la fritura como un modelo físico-químico en el que existen dos fases que son el alimento y el aceite entre las cuales se produce una transferencia de calor y de masa. El aceite transfiere calor sensible por contacto al alimento y penetra, por capilaridad, en los poros que deja el agua existente en dicho alimento al evaporarse. Este efecto está moderado por la viscosidad y la tensión superficial del aceite. Un aceite sin usar tiene poca capacidad para adherirse a la superficie del alimento en contra del gradiente de escape del vapor. Por tanto, el tiempo real que este aceite sin usar está en contacto con el alimento es muy pequeño. A medida que el aceite va siendo usado en sucesivas frituras, el tiempo de contacto con el alimento se incrementa. Según esta teoría, la causa de este aumento en el tiempo de contacto entre el aceite y el alimento es la aparición en el medio de una serie de sustancias,

Introducción

con carácter humectante, que son activas a nivel de superficie, es decir surfactantes. Estos surfactantes tienen un doble origen: los activados por el agua y los activados por el aceite. Los jabones, los fosfolípidos y las sales inorgánicas son surfactantes activados por el agua. El grupo de surfactantes activados por los lípidos incluye los polímeros térmicos de baja polaridad que presentan uniones carbono-carbono y los polímeros oxidados de alta polaridad.

Según Blumenthal (1991), los aceites pasan por cinco fases a lo largo de su período de utilización en la fritura de los alimentos.

- Fase 1ª (aceite inicial): En dicha fase el aceite es nuevo, no posee productos de degradación ni contaminantes y, por lo tanto, es poco viscoso y su poder surfactante es mínimo. Estas dos características hacen que el contacto del alimento con el aceite (mojabilidad) no sea total y, por ello, dicho alimento recibe menos calor y absorbe menos aceite.

- Fase 2ª (aceite fresco): En esta etapa se inician los procesos de hidrólisis del aceite, formándose mono y diglicéridos que incrementan ligeramente el poder surfactante de dicho aceite. Analíticamente, la grasa ve incrementada su acidez debido a los ácidos grasos liberados.

- Fase 3ª (aceite óptimo): En esta fase, el aceite posee una cantidad adecuada de sustancias emulsionantes que permiten que el contacto entre dicho aceite y el alimento se produzca de forma óptima. Asimismo, el calor que recibe el alimento y la cantidad de grasa absorbida por éste son los adecuados. Como contrapartida se empieza a formar espuma que favorece la oxidación.

- Fase 4ª (aceite degradado): Aparecen sustancias contaminantes en el aceite, y su nivel de hidrólisis y oxidación es elevado. En este caso, el alimento absorbe demasiado aceite y hay un exceso de cocción de la zona externa del alimento que se está friendo.

- Fase 5ª (aceite descartado): Se produce un agravamiento de los problemas de la fase anterior. En el aceite aparecen sabores y olores anómalos y disminuye mucho su punto de humo, lo que produce como consecuencia una atmósfera irritante en la sala donde se realiza la fritura.

Introducción

1.1.1.3.1 ADITIVOS EN LOS ACEITES.

Con el fin de mantener los aceites utilizados para freír en las mejores condiciones, se emplean los denominados aditivos. El uso de estas sustancias permite un alargamiento de la vida útil de los aceites y una mejora de la calidad organoléptica de los productos fritos.

Para evitar la autooxidación del aceite hay que disminuir la incidencia de todos los factores que la favorecen:

- Mantener al mínimo los niveles de energía (temperatura y luz) que es la desencadenante del proceso de formación de radicales.
- Evitar la presencia de trazas de metales en el aceite.
- Evitar al máximo el contacto con el oxígeno.
- Bloquear la formación de radicales libres por medio de antioxidantes los cuales, en pequeñas cantidades, actúan interfiriendo los procesos de oxidación de las grasas.

La concentración de antioxidantes tiene una influencia decisiva en la calidad de los aceites vegetales y debe ser evaluada desde dos puntos de vista: uno concerniente a la preservación antes de su uso y otro a la prevención de la autooxidación durante el cocinado.

La mayoría de los antioxidantes contienen estructuras tipo fenol que actúan a doble nivel: transfiriendo un átomo de hidrógeno al radical hidroperóxido y actuando a su vez como aceptores de los radicales libres formados en la primera fase de la autooxidación, deteniéndola a este nivel (figura 19).

Figura 19.- Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos.



Los antioxidantes con función radical libre son estables al ataque por el oxígeno, por lo que ellos mismos no pueden actuar como propagadores de la autooxidación.

Introducción

Las estructuras fenólicas cuando bloquean un radical libre no se regeneran, por lo que la cantidad de antioxidante es limitada ya que se puede gastar. Por otro lado, los antioxidantes no revierten los procesos de oxidación, sino que evitan su propagación, por ello su uso es inútil cuando el aceite se encuentra en estado avanzado de oxidación. El mayor inconveniente en el uso de antioxidantes es que la gran mayoría presentan poca estabilidad frente a temperaturas elevadas.

Los antioxidantes comunes, incluyendo los tocoferoles, hidroxianisoles butilados (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propilgalatos (PG), e hidroquinonas butiladas terciarias (TBHQ) retrasan la oxidación a temperatura ambiente, pero son menos efectivos incluso inoperantes cuando están sujetos a altas temperaturas (Chang y Mone, 1969; Gordon y Magos, 1984). Sin embargo, otros autores como Augustin y Berry (1983) y Buck (1981) opinan que las hidroquinonas butiladas terciarias (TBHQ), a pesar de que tienden a perderse por volatilización parecen ser eficaces antioxidantes en las condiciones de fritura. La adición de antioxidantes fenólicos a los aceites de fritura en combinación con siliconas ha sido estudiada por Frankel y col. (1985a) señalando que el comportamiento como grasa de fritura del aceite de soja, parcialmente hidrogenado, fue mejorado por la adición de TBHQ con metilsilicona. Esto sugiere un efecto sinérgico. Los antioxidantes más utilizados aparecen en la tabla F.

En lo que concierne a los tocoferoles, antioxidantes naturales, son poco efectivos o incluso inactivos a elevadas temperaturas (Boskou, 1988). Gordon y Magos (1984) encontraron que la adición de 0,02% del α -tocopherol calentado a 180°C no era efectivo contra la termooxidación.

Fedeli (1988) señala que el contenido de tocoferoles en el aceite de girasol es de 500 ppm, ligeramente más elevado que en el de maíz, y del orden de 3 a 5 veces que en el de oliva virgen o refinado. A pesar del elevado contenido de tocoferoles del aceite de girasol, la alteración a temperaturas entre 150-180°C, fue para Fedeli (1988) siempre más profunda que en los aceites de oliva, promoviéndose la formación de polímeros de ácidos grasos poliinsaturados en mayor extensión y siendo menor la formación de productos volátiles.

Los fitosteroles, compuestos antioxidantes naturales, parecen ser efectivos para evitar el deterioro de los aceites por los cambios indeseables que ocurren durante el calentamiento. Gordon y Magos (1984), han demostrado que no solamente el 4- α -metilesterol sino también el dimetilesterol contienen un etilideno en la cadena lateral que puede retardar la alteración

Introducción

del aceite durante calentamientos prolongados. El modo de acción de estos fitosteroles todavía no está dilucidado aunque existen diversas teorías a este respecto (Gordon y Magos, 1984). Es de destacar la eficacia de estos compuestos como antioxidantes a 180°C, a pesar de su ineficacia a bajas y medias temperaturas (Boskou, 1988).

Tabla F.- Antioxidantes naturales y añadidos a los aceites de fritura (*).

- Tocoferoles naturales
- Antioxidantes naturales
- Antioxidantes químicos permitidos ^(a)
Butilhidroxianisol (BHA)
Butilhidroxitolueno (BHT)
Propilgalato (PG)
Dodecilgalato
Butilhidroquinona terciaria (TBHQ)
Acido cítrico (como sinergista)
Dimetil polisiloxanos

^(a) sujeto a diferentes legislaciones.

(*) Adaptado de Morton y Chidley (1988).

Las siliconas se han usado también para mejorar la estabilidad de los aceites durante el calentamiento y fritura. Sakata y col., (1985) señalaron que el uso de aceite de palma para

Introducción

fritura, requiere la adición indispensable de silicona para impedir la formación de espuma y la oxidación, además de servir para prolongar la vida del producto frito.

Otro tipo de antioxidantes, poco conocido, es el de las especias y condimentos. Kimura y Kanumori (citados por Boskou, 1988) obtuvieron una patente para el uso de un antioxidante procedente de hierbas y que contiene, entre otros compuestos, flavonoides, ácido cítrico, péptidos y aminoácidos.

Recientemente, Tian y White (1994a), han demostrado la capacidad antioxidante del extracto de avena durante el almacenamiento de diversos aceites como el de soja o el de semilla de algodón. Así mismo, el extracto de avena produce una disminución de la cantidad de polímeros formados en dichos aceites como consecuencia de su uso en frituras a 180°C (Tian y White, 1994b).

1.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES DEL ALIMENTO.

1.1.2.1 Preparación.

Si en un principio es decisiva la calidad del aceite, la cual determina en parte su vida útil, es decir, el número de veces que éste puede ser empleado en frituras sucesivas, es evidente que también influye el tipo de producto que va a ser frito (Cuesta y col., 1993; Rojo y Perkins, 1987; Sánchez-Muniz y col., 1990). Esto se refiere principalmente a la cantidad de grasa del alimento que puede ser cedida al baño de fritura, si bien otros componentes que se adicionan al alimento pueden tener una importancia decisiva en la calidad final del producto frito.

Por tanto, la preparación del alimento es otro factor a considerar. Dicho alimento puede ser rebozado en harina y adicionado de sal. Esto condiciona la vida útil de un aceite y también la penetración del mismo dentro del alimento. Así, según señalan Morton y Alim (1974) la penetración del aceite dentro del alimento es diferente cuando éste posee una delgada cubierta de harina o por el contrario se encuentra rebozado. La fritura de pescado cuando éste ha sido cubierto de una delgada película de harina difiere de la fritura de las tiras de pescado rebozado ya que, en el último caso, el alimento es guisado más bien que frito, debido a que la grasa no penetra dentro del alimento sino que permanece fuera, en la cubierta.

Por otra parte, otro factor importante que determina el sabor de las grasas de fritura y por tanto de los alimentos fritos en ellas, son los compuestos de reacción del "tostado". Kaanane y Labuza (1989) señalan que la actividad del agua es muy importante en la tecnología de la fritura, tanto durante el proceso en sí como en el posterior almacenamiento del producto frito. La mayoría de los rebozados son mezclas de base acuosa que contienen tanto azúcares libres como unidos a aminoácidos (que son los precursores del tostado), con una actividad acuosa cercana al nivel en el cual se produce el máximo de tostado. Dado que la reacción del tostado se acelera mucho con el aumento de la temperatura, puede producirse con facilidad una coloración oscura y un sabor amargo en el rebozado y en la grasa de fritura. Sin embargo, no todos los productos de reacción del tostado son indeseables. Algunos proporcionan matices de sabor muy positivos y otros como algunas combinaciones de azúcar-aminoácidos, aportan un efecto antioxidante apreciable. Sin embargo, muchos de los

compuestos poliméricos y los ácidos grasos oxidados que se forman en las grasas y en las paredes de las freidoras, también son muy amargos (Kaanane y Labuza, 1989; Waller y col., 1983).

I.1.2.2 Intercambio de grasa entre los alimentos y el medio de fritura.

Junto con los cambios básicos que se producen en la grasa empleada en fritura es necesario considerar las interacciones que tienen lugar tanto entre las grasas y otros componentes lipófilos de los alimentos y las grasas de fritura, así como entre los productos de reacción y otros compuestos presentes en el alimento y la grasa culinaria. Entre estos últimos estarían los producidos por la reacción entre los hidroperóxidos y otros compuestos polares de alteración de las grasas, con grupos amino, hidroxilo y carboxilo pertenecientes a los componentes fundamentales del alimento. Su complicado estudio se inició partiendo de sistemas simplificados (Sims y Fioriti, 1975).

En cuanto a la cinética de penetración de la grasa dentro del alimento ha sido muy estudiada en el ITERG de París por Guillaumin, en USA por Blumenthal y en España por Varela. Nuestro grupo también ha realizado algunos trabajos en este campo (Arroyo, 1991; Figueroa, 1984; Garrido-Polonio y col., 1994; Hernández, 1989; Sánchez-Muniz y col., 1989, 1993a, 1995).

En todos los casos anteriores se emplearon las patatas como alimento modelo de estudio debido a su simplicidad. El estudio de la fritura de alimentos más complejos que las patatas entraña mayores dificultades, habiéndose señalado que alimentos con un contenido graso elevado absorben menos grasas durante la fritura que alimentos más magros (Mal y col., 1978).

Según Guillaumin (1988) hay diferentes parámetros que condicionan la absorción de grasa por las patatas.

a) Dependientes del alimento:

- El contenido de agua de las patatas o su peso específico. La absorción de grasa por las patatas es menor cuanto mayor es su peso específico, es decir, cuando su contenido de agua es mayor.

- La superficie de contacto del alimento con el medio de fritura. Cuanta más superficie tenga el alimento más grasa absorberá del medio. Así, por ejemplo, una patata tipo *chip* tendrá mas superficie que una patata frita a la francesa, estando el contenido graso de las tipo *chip* generalmente cercano a un 40%, mientras que para unas patatas a la francesa se encuentra próximo al 9%.

En un trabajo previo realizado en nuestro Departamento (Figueroa, 1984) con fritura de patatas, cortadas en rodajas de 1,5 mm de grosor, observó un contenido graso en las mismas que osciló entre 28,7% y 40,2%, obteniéndose los valores más elevados de retención grasa en la fritura vigésima. Sánchez-Muniz y col. (1989) encontraron que el contenido graso de patatas fritas tipo *chip* en aceite de oliva fue del 27,3% en la fritura número 15; estos mismos autores (Garrido-Polonio y col., 1994) obtuvieron un contenido graso de patatas fritas en aceite de girasol entre 27-40%.

b) Dependientes de la grasa:

La estabilidad de la grasa al calor depende del grado de insaturación de sus ácidos grasos y de la presencia en cantidad considerable de triglicéridos poliinsaturados. Así, por ejemplo, la trilinoleína en el aceite de girasol representa un 35% de sus glicéridos totales (Guillaumin, 1988). La autooxidación, oxidación y polimerización térmica causan un incremento en la viscosidad del medio de fritura, lo cual incrementa la absorción de aceite por el alimento.

La cantidad de grasa absorbida por el alimento depende también de la presencia de surfactantes en el aceite ya que, dichos agentes de superficie, permiten que se prolongue el tiempo de contacto entre el alimento y la grasa de fritura, y por ello se produzca una mayor absorción de ésta por parte del alimento (Blumenthal, 1991). La cantidad de surfactantes en un aceite es mayor al aumentar la alteración de dicho aceite (Blumenthal, 1991). Sánchez-Muniz y col. (1993a) y Garrido-Polonio y col. (1994) encontraron que el contenido de grasa

Introducción

en las patatas se incrementó con el número de frituras, lo cual relacionaron con una mayor degradación del aceite y a su vez con la formación de surfactantes.

Varela y col. (citados por Guillaumin, 1988), usando un método fluorimétrico, determinaron el área donde se absorbe preferentemente la grasa en el alimento frito, encontrando que es en la corteza donde se acumula principalmente dicha grasa. Según estos autores, el aceite de oliva forma una corteza fina mientras que otras grasas producen una corteza más gruesa y menos compacta y definida. Por ello el empleo de aceite de oliva en frituras debería producir un producto frito de mejor calidad.

c) Dependientes de las condiciones de fritura:

- Influencia de la temperatura. Varela (citado por Guillaumin, 1988) estableció que la temperatura de la grasa del medio de fritura, la cual se sitúa como ya dijimos entre 150 y 180°C, no tiene un efecto significativo sobre la absorción de grasa por el alimento frito. No obstante, cuando la temperatura se incrementa (por encima de los 220°C), se absorbe menos aceite. Sin embargo, estas consideraciones serían irreales, ya que nadie usa tales temperaturas para freír alimentos.

- Influencia del tiempo de fritura. Cuando las patatas permanecen en el medio de fritura durante un tiempo largo, la absorción del aceite es generalmente mayor que si el tiempo es menor. Además, cuando la grasa se utiliza muchas veces (después de 15 a 20 frituras y debido a la disminución de volumen del aceite utilizado) el tiempo de fritura se incrementa y el alimento absorbe más grasa.

1.1.2.3 Calidad de la grasa absorbida por los alimentos.

En 1988 Guillaumin realizó un estudio de fritura de patatas en aceite de girasol y, después de las frituras, drenó el alimento frito con un papel absorbente extrayendo posteriormente la grasa de dicho papel. Al comparar la composición de la grasa del medio y la extraída del papel se comprobó que ésta última estaba enriquecida en glicéridos y ésteres modificados. Estos resultados indicaban que donde se acumulaban los glicéridos modificados era en la superficie del alimento frito.

Figueroa (1984) utilizando ácido pentadecanoico como estándar interno, encontró diferencias en la composición de la grasa del baño de fritura y la grasa absorbida por el alimento, lo que sugería una dinámica de penetración diferente para los distintos ácidos grasos que constituían ambas grasas.

Sánchez-Muniz y col. (1989) también encontraron que la composición de la grasa extraída de patatas fritas en aceite de oliva, fue ligeramente diferente a la de los aceites que quedan en las freidoras ya que su contenido en compuestos polares o alterados fue mayor. Se obtuvieron resultados similares friendo patatas en aceite de girasol de forma repetida y discontinua (Arroyo, 1991; Garrido-Polonio y col., 1994; Sánchez-Muniz y col., 1995).

Lo expuesto anteriormente se refiere a fritura de patatas. Indudablemente, existen otras consideraciones en el caso de otro tipo de alimentos, ya que cuando éste se fríe, llega a enriquecerse en grasa dependiendo del contenido graso del alimento crudo.

Mai y col. (1978) en un estudio realizado en frituras de pescado fresco observaron que, cuanto más alto era el contenido en grasa del pescado, menor era el intercambio de grasa entre dicho alimento y la grasa culinaria. Por el contrario, cuando el pescado tenía menos contenido en grasa, absorbía más grasa y tendía al final a tener una composición similar a la del aceite usado en la fritura.

Sánchez-Muniz y col., (1992) en un experimento realizado sobre la composición en ácidos grasos de sardinias crudas y fritas en aceite de oliva, de girasol y en manteca de cerdo, observaron resultados paralelos. El contenido de ácido oleico se incrementó ligeramente en el alimento frito en el caso de la manteca y del aceite de girasol, y de forma pronunciada cuando se empleó aceite de oliva. El contenido de ácido linoleico se elevó aunque ligeramente con el empleo de aceite de oliva y manteca, y marcadamente con el de girasol. Los ácidos grasos poliinsaturados, representados por el eicosapentaenoico y el docosahexaenoico disminuyeron en las sardinias fritas en todos los casos. Por último, en el producto frito, la relación insaturados/saturados se elevó al usar aceite de oliva y girasol, pero no al utilizar manteca.

Resumiendo, se puede decir que cuando se fríe, el alimento se enriquece en grasa y este enriquecimiento depende del contenido de grasa del alimento crudo. Según Moreiras-Varela y col. (1988), este enriquecimiento lipídico supone un incremento en el contenido energético del alimento y puede contribuir además al transporte de componentes liposolubles, tales como los ácidos grasos insaturados y posiblemente las vitaminas liposolubles. De la

misma forma, la grasa absorbida por el alimento procedente del medio de fritura puede contribuir a la obtención de un producto frito más equilibrado en ácidos grasos desde el punto de vista de la salud (Sánchez-Muniz y col., 1992).

1.1.3 VARIABLES DEPENDIENTES DEL PROCESO.

1.1.3.1 Temperatura.

Las alteraciones de las grasas producidas por el calor han sido descritas por muchos autores (Perkins y Akkeren, 1965; Lomanno y Nawar, 1982), señalándose que a partir de los 200°C el efecto es mucho más drástico (Gere, 1983a).

Las frituras se deben realizar a la mínima temperatura posible (usualmente 180-185°C) y sin variaciones bruscas. Para ello se debe disponer de un buen termostato y verificarlo periódicamente (Monferrer y Villalta, 1993a). Es aconsejable, para evitar el posible sobrecalentamiento del aceite, establecer corrientes de convección o más sencillamente agitar el cestillo de la freidora durante la fritura.

Fedeli (1988) en sus trabajos sobre fritura, describe que la velocidad de degradación de un aceite es proporcional a la temperatura de calentamiento y al tiempo que dura el proceso de fritura. Robertson (1967), afirma que la temperatura de fritura no debe ser tan alta que queme la grasa, incluso localmente. Según este autor, el calor requerido para la fritura debe ser distribuido lo más uniformemente posible a lo largo de un amplio área de superficie de calentamiento.

Las diferencias de temperatura entre la zona de calentamiento y el aceite de la freidora deben ser leves. Situar la fuente de calor muy apartada de la freidora implica tener que elevar mucho la temperatura en ese punto para compensar las pérdidas ocasionadas por el recorrido.

Es importante comentar que la fritura es un proceso dinámico donde la temperatura del baño de fritura varía debido a la adición del alimento y a los procesos de evaporación de agua y absorción de grasa (Cuesta y Sánchez-Muniz, 1991; Guillaumin, 1988).

I.1.3.2 Tiempo y tipo de calentamiento.

Un incremento en la duración de la fritura produce una mayor alteración (Morrison y Robertson, 1978; Bracco y col., 1981). Por otra parte, el tiempo de calentamiento determina la estabilidad y la formación de diferentes compuestos de alteración (Nawar, 1985a). Así, la formación de polímeros sucede en tiempos de calentamiento cortos, aunque tales polímeros presentan gran estabilidad a largo plazo.

Según Peers y Swoboda (1982) el tipo de calentamiento también es decisivo, ya que si éste es discontinuo produce mayor degradación en la grasa que el continuo. Esto se debe a que a una temperatura elevada, las reacciones oxidativas se desarrollan en la superficie en contacto con el aire, mientras que durante el entriamiento disminuye la velocidad de las mismas, y se favorece la adsorción de aire por el aceite lo que provoca una mayor formación de hidroperóxidos y radicales libres al calentar de nuevo. Las freidoras, por esta razón, llevan una tapa de metal apropiado para limitar el contacto del aceite con el aire y evitar la incidencia de la luz, durante los largos períodos de tiempo en que no son usados. La mayor degradación del aceite supone asimismo una menor calidad del producto frito (Peers y Swoboda, 1982).

Varela (citado por Morton y Chidley, 1988), usando modelos de freidoras extremadamente simples, llegó a la conclusión de que existen dos mecanismos de calentamiento, uno calentando el aceite en sartén hasta que alcance la temperatura adecuada para la fritura, y otro en freidoras donde existe un mecanismo sensible de control y de regulación del calor.

I.1.3.3 Relación superficie/volumen.

Al aumentar la cantidad de grasa en contacto con el aire, debido al incremento de la relación superficie/volumen, se ejerce un efecto determinante sobre la velocidad de alteración de la grasa (Bracco y col, 1981), aumentando la posibilidad de las reacciones oxidativas (Monferrer y Villalta, 1993a). Esto justifica, al menos en parte, la utilización de sartenes hondas de gran capacidad en el área mediterránea, o en su defecto, freidoras.

1.1.3.4 Relación aceite/alimento.

La relación entre el volumen de aceite empleado respecto a la cantidad de alimento que se fríe, es también un factor importante a tener en cuenta. La freidora no debe estar sobrecargada de alimento para que la calidad del producto frito no se vea alterada. Una relación 6:1 de aceite/alimento es la que normalmente se emplea. Nuestro equipo utiliza en fritura de patatas en freidora la relación 6:1 (Arroyo y col., 1992; Cuesta y col., 1993; Garrido-Polonio y col., 1994; Hernández y col., 1989; Sánchez-Muniz y col., 1989, 1993a, 1994), mientras que para fritura de sardinas la relación se mantiene entre 4,6-5:1 (Sánchez-Muniz y col., 1990, 1992).

1.1.3.5 Adición de aceite nuevo.

La adición de aceite nuevo, práctica habitual para compensar las pérdidas de volumen de aceite debidas a la capacidad del alimento de absorber la grasa culinaria, podría ser beneficiosa ya que produce una dilución de los productos de alteración.

Se denomina grado de renovación (GR) o *turn-over* a la proporción de aceite por hora que se debe reponer para compensar las pérdidas producidas por el arrastre o la absorción de aceite por parte del alimento (Monferrer y Villalta, 1993b):

$$\% GR = \frac{\text{Aceite añadido por hora}}{\text{Capacidad de la freidora}} \times 100$$

Algunas veces se define el grado de renovación como el tiempo necesario para que el volumen de aceite añadido para compensar las pérdidas, sea igual al volumen total de la freidora (Monferrer y Villalta, 1993b).

Sin embargo, para unos autores sería beneficioso añadir aceite frecuentemente (Billek, 1985; Pérez-Camino y col., 1987; Robertson, 1967; Sánchez-Muniz y col., 1993b), mientras que otros como Gere (1982) mediante experiencias paralelas de fritura, en un caso con adición de aceite sin usar para compensar el que ha sido absorbido por el producto frito, y en otros sin adición, comprobó que el aceite se deterioraba más rápidamente al adicionar

Introducción

aceite sin usar, siendo esto atribuido al efecto catalítico de los productos de degradación presentes en el aceite usado, los cuales promueven el deterioro del que ha sido adicionado. Resultados similares fueron obtenidos por Stevenson y col. (1984).

I.1.3.6 Filtración.

Uno de los aspectos más importantes de cualquier sistema de fritura, es la eliminación de restos de alimento frito y de trozos de rebozado y empanado carbonizados, comúnmente llamados *cracklings* (Jacobson, 1991). Estos pueden arruinar el aspecto y apariencia del alimento frito, darle sabor amargo, así como participar en el oscurecimiento y alteración de la grasa de fritura (Landers y Rathmann, 1981). Si la grasa se calienta a través del fondo del recipiente, los *cracklings* no sólo se oscurecen excesivamente, sino que impiden la transferencia de calor entre la grasa culinaria y el alimento (Jacobson, 1991).

Para eliminar dichos restos pueden usarse varios tipos de cribas, cartuchos y papeles de filtro, con o sin ayuda de medios auxiliares de filtración. Las cribas quitan las partículas más grandes y por eso deben constituir el primer paso en la eliminación de los *cracklings*, luego se debería pasar la grasa por un medio auxiliar de filtración, contenido en un filtro cerrado.

A nivel industrial es común el uso de tierra de diatomeas y otros preparados en polvo para adsorber los compuestos contaminantes que permanecerían disueltos en la grasa de fritura contribuyendo a su degradación y que no son eliminadas por una simple filtración.

I.1.3.7 Material de la vasija.

Otro factor importante a considerar, es el material con el que está fabricado el receptáculo de la freidora. No se deben usar materiales que cedan trazas de metales al aceite puesto que, dichos metales, actúan como catalizadores acelerando todas las reacciones de degradación. Por ello se debe evitar el uso de recipientes fabricados de cobre, latón o bronce (Varela y col., 1988), mientras que se recomienda la utilización de materiales como el acero inoxidable (Monferrer y Villalta, 1993a).

Introducción

En un estudio, utilizando distintos aceites comestibles, Varela y col. (1983) analizaron la influencia de freír en sartén de hierro, respecto a la fritura en freidora doméstica, observando que los cambios experimentados por los índices analíticos de carácter general (odo, refracción y peróxidos) fueron menores al freír en sartenes de hierro, ya que se freía ininterrumpidamente en el aceite caliente, mientras que en los ensayos en freidoras domésticas, se dejaba enfriar el aceite entre frituras, lo cual contribuye como es sabido, a favorecer la alteración de las grasas de fritura. No obstante en Andalucía es muy común la utilización de sartenes profundas de hierro, en donde la superficie del aceite en contacto con el aire es relativamente pequeña en comparación con el volumen de aceite que puede contener (Varela y col., 1983).

Debido a la posible implicación del aluminio en la enfermedad de Alzheimer, en algunos países se ha considerado la retirada del mercado de vasijas que contengan aluminio, (del Castillo, 1991, Comunicación personal).

I.1.3.8 Equipos de fritura.

Básicamente, el proceso de fritura tiene lugar en sartén o en freidoras para uso doméstico y restaurantes, o bien en freidoras usadas a escala industrial para producir grandes cantidades de alimentos fritos y preritos con fines comerciales (Morton y Chidley, 1988; Cuesta y Sánchez-Muniz, 1991). El equipo utilizado posee un papel tan importante como el de la grasa en la fritura, tanto a nivel de diseño como de limpieza y mantenimiento (Monferrer y Villalta, 1993a).

I.1.3.8.1 TIPOS DE FREIDORAS.

I.1.3.8.1.1 Discontinuas.

Se utilizan principalmente a nivel doméstico, en hostelería, restauración y *catering*, y muy poco en la industria alimentaria. La fritura se realiza por lotes, es decir, se introduce

Introducción

una cantidad adecuada de alimento en la cesta y se fríe, no añadiendo más producto hasta que se retire el primero.

- Doméstica: es la más sencilla de todas. Consta de un recipiente con una resistencia para calentar el aceite y un cestillo para colocar el producto. Suelen tener una capacidad de 3 a 5 litros (Monferrer y Villalta, 1993a).

- Con cámara de agua: es como la anterior, pero por debajo del nivel de aceite tiene una cámara de agua. Las partículas de producto o rebozado tienden a depositarse en el fondo y es fácil eliminarlas mediante la válvula de salida de agua. Una vez frío el aceite, se recupera el nivel de agua añadiéndola sobre el mismo, ya que, debido a su diferente densidad, tienden a separarse. Tienen como inconveniente una mayor velocidad de hidrólisis del aceite, pero su efecto de alteración queda compensado por la facilidad de eliminación de las partículas requemadas. En movimientos bruscos del cestillo durante la fritura, pueden mezclarse aceite y agua con las consabidas salpicaduras de aceite caliente.

- Giratoria: el funcionamiento es similar al de la freidora doméstica, pero el cestillo es circular y está colocado inclinado respecto al plano horizontal, y al girar, el alimento tiene períodos de fritura alternados con otros fuera del aceite. Se utiliza en algunos productos con rebozados especiales.

- Con calentamiento espiral: la resistencia forma una espiral alrededor de toda la cubeta, con lo que se consigue que el reparto de calor sobre el aceite sea más uniforme y menos agresivo, evitándose los puntos de calor y permitiendo un ligero incremento de su vida útil.

1.1.3.8.1.2 Continuas.

Son las utilizadas en las industrias de *snacks*, precocinados, etc. Suelen ser alargadas y constan de un cuerpo, tapa, cintas, termostato y sistema de calentamiento que puede ser interno (sobre la misma freidora, con lo cual hay menos pérdida de energía) o externo (a

Introducción

cierta distancia). El volumen es muy variable, dependiendo de la capacidad de producción de la industria, oscilando los más usuales entre 300 y 1.000 litros.

- El calentamiento por quemador, ya sea interno o externo, es agresivo para el aceite, ya que la temperatura es muy alta y suele estar localizada en puntos muy concretos.

- El calentamiento por resistencias no es tan agresivo si se tiene en cuenta instalar una gran superficie de resistencia que permita disminuir la temperatura de la misma. Lo que se tiende a buscar es la menor potencia por unidad de superficie (disminuir los W/cm^2) para castigar lo menos posible al aceite.

- El calentamiento por medio de un fluido térmico es el más suave para el aceite de la freidora, ya que el choque térmico más fuerte lo soporta el fluido intermedio que, posteriormente, lo transmitirá al aceite por medio de un intercambiador. Se debe tener en cuenta que, en ningún momento, ambos fluidos deben estar en contacto.

En cualquier caso, en las freidoras industriales la adición de aceite nuevo es continua asegurando un adecuado recambio del aceite que contribuye al mantenimiento de un bajo nivel de alteración (concentración de componente polar) en el aceite de fritura (Pérez-Camino y col., 1988a).

1.2 EVALUACION ANALITICA DE LA ALTERACION DE LOS ACEITES DE FRITURA.

El incremento producido en el consumo de grasas que han sido empleadas en fritura y por ello, sometidas a calentamiento, ha tenido como consecuencia que distintos sectores, entre los que destacan las Administraciones Públicas y los Consumidores, estén interesados en conocer el alcance de la alteración producida en las grasas para establecer límites en su utilización.

Por ello, uno de los objetivos fundamentales en el estudio de las grasas utilizadas en fritura es encontrar métodos analíticos exactos y reproducibles que proporcionen una buena medida de la degradación producida durante la fritura.

En décadas precedentes la evaluación estaba basada exclusivamente en índices analíticos de carácter general (viscosidad, índice de peróxidos, de acidez, etc.), relacionados con grupos de compuestos originados durante la fritura, pero sin posibilidad de establecer una relación entre la variación de estos índices y la alteración total.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas de separación, ha abierto en los últimos años perspectivas más favorables desde el punto de vista analítico y ha permitido iniciar la puesta a punto de métodos que evalúen la alteración de forma directa, cuantificando los nuevos compuestos producidos.

Este capítulo se ha dividido en tres apartados que responden a las tendencias más destacadas en el análisis de las grasas procedentes de fritura:

- 1) Evaluación mediante índices de carácter general.
- 2) Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.
- 3) Cuantificación de los productos específicos de la alteración.

1.3.1 INDICES ANALITICOS DE CARACTER GENERAL.

El desarrollo de la alteración producida en la grasa utilizada en frituras, origina una serie de cambios físico-químicos en la grasa, como ya se explicó en el apartado 1.1.1.3.

Introducción

Todos estos cambios generales han sido utilizados rutinariamente para la evaluación de las grasas de tritura, y sus variaciones han servido para establecer diferencias en el comportamiento de distintos aceites y grasas (Coll Hellin y Rueda Clausell, 1984; Huang y col., 1981; Morrison y Robertson, 1978; Plessis y Niekerk, 1981), para analizar la influencia de distintas variables (Giere, 1982; Paradis y Nawar, 1981; Sanelli, 1979), o, incluso partiendo de un aceite y condiciones determinadas, evaluar la correlación entre las medidas que dichos índices proporcionan (Cuesta y col., 1991a; Paradis y Nawar, 1981; Pardum y col., 1974; Sánchez- Muniz y col., 1994; Waliking y Zmachinsky, 1970). Una relación de estos índices analíticos generales aparece en la tabla G.

Tabla G.- Índices analíticos basados en cambios químicos y físicos generales (*).

INDICES ANALITICOS	COMPUESTOS ALTERADOS RELACIONADOS
Análisis físicos	
Viscosidad	Polímeros
Color	Compuestos carbonílicos α,β insaturados
Formación de espuma	Polímeros
Absorción ultravioleta	Dienos y trienos conjugados
Constante dieléctrica	Compuestos polares
Caracteres organolépticos	Componentes volátiles
Análisis químicos	
Acidez libre	Ácidos grasos libres
Índice de yodo	Dobles enlaces
Índice de peróxidos	Peróxidos
Reacciones colorimétricas	Ácidos grasos oxidados

(*) Tomado de Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988).

Introducción

Entre sus características destacan su fácil y rápida realización, no requerir equipos costosos o de difícil manejo y proporcionar resultados exactos y reproducibles, todas ellas características positivas que los hacen muy apropiados como métodos de control en industrias relacionadas con la fritura de alimentos.

No obstante, hay que tener en cuenta una exigencia mínima que debe cumplir cualquiera de ellos, y es, lógicamente que su valor esté relacionado con la alteración producida y sólo con ella. Desde este punto de vista, los índices clásicos no están exentos de algunos de los siguientes inconvenientes:

- 1.- Tomar por necesidad como valor de referencia el de la grasa de partida antes de comenzar a freír.
- 2.- Evaluación de un aspecto muy parcial de la alteración e incluso en algún caso, no directamente relacionado con ella.
- 3.- Dependencia de otros factores ajenos a la alteración de la grasa e influenciados por la solubilización de componentes del alimento.

La enumeración de los inconvenientes de estos índices, sólo pretende avisar sobre la utilización indiscriminada de los mismos y no implica, de ningún modo, la duda sobre su eficiencia y utilidad en situaciones donde se demuestre su validez (Cuesta y col., 1991b; Sánchez-Muniz y col., 1994; Smith y col., 1986).

Su utilidad se pone de manifiesto por las correlaciones positivas encontradas entre los mismos y los métodos que valoran los compuestos polares, los cuales están relacionadas directa y específicamente con la degradación de las grasas que han sido empleadas en frituras (Cuesta y col., 1991b; Sánchez-Muniz y col., 1994).

I.2.2 EVALUACION DE LA ALTERACION TOTAL.

La medida directa de la alteración tiene la enorme ventaja de eliminar los inconvenientes de los índices clásicos, ya que, junto a la posibilidad de evaluar compuestos específicamente relacionados con la degradación, existe un claro valor de referencia para la grasa inicial, donde la cantidad de los compuestos alterados debe ser prácticamente nula.

Introducción

El desarrollo de estos métodos está directamente relacionado con la mejora de las técnicas cromatográficas, como puede verse en la tabla II donde se resumen las principales determinaciones.

Tabla II.- Métodos analíticos para la cuantificación de compuestos alterados (*).

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	TECNICA UTILIZADA
Determinación Global	
- Compuestos polares (triglicéridos)	Cromatografía en columna de sílice Cromatografía líquida
- Material no eluido (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Ésteres metílicos no polares	Cromatografía en columna de sílice Cromatografía gas-líquido
Determinaciones Específicas	
- Monómeros cíclicos (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros no polares (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Polímeros (triglicéridos o ésteres metílicos)	Cromatografía líquida

(*) Tomado de Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988).

El objetivo de esta evaluación es la separación de la muestra en dos fracciones, una de ellas conteniendo la parte de la grasa que queda sin alterar, mientras que en la segunda se concentran los productos de degradación. La diferencia de polaridad entre ambos grupos de compuestos constituye la base de esta separación que puede realizarse partiendo de la propia grasa, lo que sin duda simplifica la metodología analítica, o bien obteniendo previamente derivados más simples, fundamentalmente ésteres metílicos para disminuir la complejidad de la muestra.

La determinación de la alteración partiendo directamente de la grasa ha sido puesta a punto utilizando la cromatografía líquida (Aitzetmüller, 1973a, 1973b y 1988) y la cromatografía clásica en columna (Billek y col., 1978; Dobarganes y col., 1989; Sen Gupta, 1976).

En el primer caso el análisis se realiza en aproximadamente 20 minutos con resultados muy reproducibles, pero exige un complicado sistema de acondicionamiento de la columna, así como de disponer de un instrumental muy complejo. Por otra parte, la obtención de resultados fiables está condicionada a un tratamiento complicado del eluido y de la columna, consistente en la eliminación del disolvente, combustión y reducción de los productos de pirólisis a metano que pasa finalmente a un detector de ionización de llama.

Por el contrario, el método que utiliza la cromatografía en columna, también de alta reproducibilidad, se caracteriza por la simplicidad de los medios requeridos para su puesta a punto y ha sido propuesto por la IUPAC¹, para la evaluación de las grasas de frituras, y más recientemente como método oficial (Ministerio de Relaciones con la Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989). Dicho método se describirá detenidamente en el capítulo de Materiales y Métodos (apartado III.1.3.2.2).

En cuanto a los métodos de la evaluación total de la alteración, partiendo de los ésteres metílicos, cabe destacar el semimicrométodo desarrollado por Guillaumin (1973), para la determinación de especies químicas nuevas mediante cromatografía en columna de alúmina, obteniéndose distintas fracciones eluidas con disolventes de polaridad creciente y la determinación de compuestos no eluidos en cromatografía gas líquido (Waltking, 1975).

No obstante, la reproducibilidad de estos métodos que parten de una pequeña cantidad de muestra, es muy inferior a la de los procedimientos descritos anteriormente.

Por ello es interesante la modificación recomendada por la IUPAC (Dobarganes y col., 1989) y la anteriormente citada en relación a los ésteres metílicos (Cuesta y col., 1991a;

Introducción

Dobarganes y col., 1984a; Hernández y col., 1989). Una vez llevada a cabo la transesterificación de la grasa y la elección del disolvente adecuado, es posible medir cuantitativamente los ácidos grasos que han sido alterados en el proceso de fritura, con los mismos valores de reproducibilidad que la determinación de la cual procede.

La principal diferencia entre ambos métodos es que, mediante la separación de la grasa se obtiene una medida de la alteración total de los triglicéridos, mientras que si determinamos los ésteres metílicos cuantificamos sólo la alteración producida en los ácidos grasos de estos triglicéridos.

Hernández y col., (1989) indican, no obstante, una alta correlación entre los valores obtenidos para la fracción de triglicéridos no polares y para la fracción de ésteres metílicos.

Diferentes autores han señalado la especificidad de la medida del componente polar para determinar la alteración de los aceites de fritura. Así Ancin Azpilicueta (1991) señala que en un experimento realizado con aceite de oliva y en el que se determinan diferentes índices físico-químicos: índice de acidez, índice de iodo, índice de peróxidos y el componente polar, éste último es el más decisivo para apreciar los cambios producidos en el calentamiento de dicho aceite. Fritsch (1981) opina que la determinación del componente polar total es uno de los mejores índices para comprobar la alteración de las grasas de fritura.

Según Castellón Arnau (1989) la determinación de los ésteres metílicos polares alterados, frente a la de los triglicéridos polares supone obviar la sobrevaloración en que se incurre en el segundo método del componente polar. Además indica las ventajas del análisis de los ésteres metílicos a temperatura ambiente frente al análisis de los ésteres metílicos polares obtenidos por metilación en caliente y utilizando cromatografía en columna con gel de sílice. Este método supone más rapidez, economía de reactivos, integridad de los compuestos alterados y posibilidad de automatización, si bien se contrarresta con menor exactitud y la necesidad de un cromatógrafo de gases.

Cuesta y col., (1991b) estudiaron la alteración de un aceite de oliva durante 15 frituras sucesivas y discontinuas de patatas analizando distintos índices físico-químicos (índice de refracción, color, peróxidos, iodo y medida espectrofotométrica a 270 nm) y determinaron la concentración de compuestos polares encontrando que los coeficientes de correlación entre los distintos índices analíticos y el porcentaje de los ésteres metílicos no polares fueron mayores que los obtenidos con el porcentaje de triglicéridos no polares, destacando la

correlación existente entre los índices de refracción y color con el porcentaje de ésteres metílicos no polares. No obstante, también los coeficientes de correlación entre los distintos índices analíticos y el número de fritura, era elevados.

1.2.3 CUANTIFICACION DE LOS COMPUESTOS ESPECIFICOS DE LA ALTERACION.

Un tercer nivel de evaluación de las grasas termooxidadas está relacionado con los procedimientos complejos que incluyen el fraccionamiento y el análisis estructural de los compuestos de alteración, cuyo objetivo es obtener una información completa y detallada de la distribución de los compuestos degradados. Esta información permite relacionar la incidencia de los diferentes grupos de compuestos sobre los efectos fisiológicos y para desarrollar nuevos métodos analíticos más simples que puedan servir para controlar la alteración. Los sistemas más clásicos están basados en la diferencia de solubilidad (Privett, 1959) o en la distinta capacidad de los compuestos para formar aductos con la urea (Boelhower y col., 1967).

La cuantificación de compuestos específicos de la alteración como los monómeros cíclicos y los compuestos poliméricos, supone un gran avance en la caracterización de las grasas de fritura.

Así, la importancia de los monómeros cíclicos, que se originan por ciclación intramolecular de los ácidos grasos poliinsaturados, es debida tanto a su toxicidad potencial como a su especificidad respecto a la alteración térmica.

Su determinación se realiza a partir de los ésteres metílicos, mediante cromatografía gas-líquido, previa hidrogenización de la muestra, incluyendo la mayoría de los métodos un paso intermedio de aducción con urea (Giere y col., 1984; Potteau y col., 1970; Rojo y Perkins, 1987), o cristalización a baja temperatura (Meltzer y col., 1981) para eliminar la mayor parte de los ésteres metílicos no alterados y conseguir una concentración de los compuestos de interés. La caracterización estructural de dichos compuestos se realiza mediante la espectrometría de masas asociada a la cromatografía gaseosa (Rojo y Perkins, 1987; Sebedio y col., 1989). No obstante, debido a la naturaleza química aún desconocida de algunos de los monómeros cíclicos originados, a su baja concentración en la muestra total

y a la complejidad de la metódica, la exactitud y reproducibilidad del método son discutidas (Grandgirard y Julliard, 1983). Aunque su formación es a partir de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, esta determinación es importante en la evaluación de aceites que contengan cantidades significativas de ácido linolénico.

Para la determinación de los compuestos poliméricos se usa preferentemente la cromatografía de exclusión sobre gel en la cual las moléculas de mayor tamaño son eluidas las primeras, mientras que las moléculas más pequeñas penetran en los poros del gel y su elución es retardada (Perrin y col., 1984). Dicha técnica permite una separación y cuantificación de los diferentes compuestos característicos de la degradación termooxidativa e hidrolítica formados en las grasas como consecuencia de la fritura de alimentos.

Aún cuando es una determinación de gran interés, es difícil conseguir una buena separación de estos compuestos por constituir un grupo poco homogéneo tanto en peso molecular como en polaridad (White y Wang, 1986). Por ello es necesario fijar bien las condiciones de trabajo, ya que las variables que influyen son múltiples y van desde la preparación de las muestras hasta la elección de las fases móvil y estacionaria, así como de los sistemas de detección empleados (Christopoulou y Perkins, 1986).

Los análisis pueden realizarse sobre muestras de grasa enteras (Fellat-Zarrouck y col., 1988) o bien realizando una previa concentración de la muestra en compuestos alterados con el objeto de estudiar más específicamente los productos nuevos originados durante la degradación de la grasa (Arroyo y col., 1992; Dobarganes y col., 1988). La concentración de la muestra en compuestos polares se puede realizar mediante cromatografía en columna (Dobarganes y col., 1988; Gere, 1984; Perrin y col., 1984) o también con el uso de cartuchos Sep-pack (Sotirhos y col., 1986) que permiten trabajar con menores cantidades de disolventes y en menor tiempo.

Por otro lado, las muestras de grasa pueden saponificarse y metilarse antes de ser analizadas por HPLC (Perkins y Pinter, 1988; Perrin y col., 1985) para así poder separar y cuantificar los compuestos poliméricos formados al establecerse enlaces tanto intra como intermoleculares entre distintos restos acilos de las moléculas de los glicéridos.

Jensen y Moller (1986) separaron por cromatografía de permeación en gel muestras de grasa previamente hidrolizadas y transesterificadas obteniendo fracciones de trímeros, dímeros y monómeros de ácidos grasos que después analizaron estructuralmente por espectrofotometría de masas.

Márquez-Ruiz y col. (1990b) utilizaron una combinación de los métodos de cromatografía en columna y HPLC para separar muestras previamente metiladas y cuantificar así compuestos como los dímeros no polares de ácidos grasos, que son específicos de la alteración térmica.

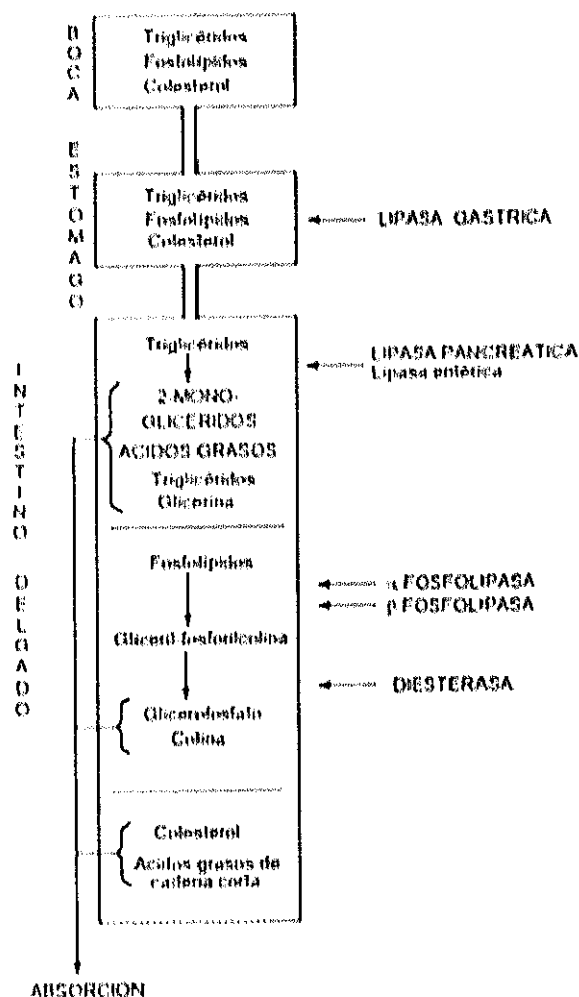
Los sistemas de detección usados en este tipo de análisis van desde los detectores de ultravioleta (Gere, 1984; Perkins y Pinter, 1988; Sotirhos y col., 1986), que son muy específicos ya que detectan únicamente los compuestos que han sufrido cambios durante el calentamiento (White y Wang, 1986), hasta los detectores de índice de refracción (Dobarganes y col., 1988; Perrin y col., 1985), que tienen la ventaja de presentar similares factores de respuesta para todos los componentes que tiene la muestra analizada (Arroyo y col., 1992; Jensen y Moller, 1986; Sánchez-Muniz y col., 1993a, 1994).

1.3 LIPASA PANCREATICA.

1.3.1 DIGESTION DE LAS GRASAS DIETARIAS.

Los lípidos mayoritarios de la dieta son fundamentalmente los triglicéridos, y en menor cantidad, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol. Uno de los principales problemas relacionados con su digestión y absorción, es que estos productos son insolubles en agua y deben sufrir una hidrólisis total o parcial para poder penetrar en el organismo a través de la barrera intestinal. La digestión de lípidos se resume en la figura siguiente (figura 20) (Varela y Mataix, 1979):

Figura 20.- Digestión de los lípidos dietarios.



Introducción

La hidrólisis de las grasas de la dieta se produce fundamentalmente en el intestino delgado, si bien, este proceso se inicia ya antes en el estómago, aunque de forma muy limitada, por la acción de la lipasa gástrica (Cohen y col., 1971). Esta lipasa es diferente de la lipasa pancreática ya que tiene menor peso molecular que ésta, y es muy estable y activa en condiciones de pH ácido situándose su pH óptimo entre 5 y 6 (Verger y col., 1994).

La lipasa gástrica hidroliza preferentemente los triglicéridos de cadena corta y media (Clark y col., 1969; Engstrom y col., 1968). Esta lipasa es particularmente importante en lactantes ya que la leche de muchas especies está enriquecida en ácidos grasos de cadena media (Helander y Olivecrona, 1970).

Los triglicéridos de cadena larga, por otro lado, son emulsionados y posteriormente hidrolizados por la lipasa pancreática en el intestino delgado (Guyton, 1992). Las sales biliares tienen poca capacidad emulgente por sí mismas (Dreher y col., 1967); sin embargo en colaboración con lípidos muy polares (lecitina, monoglicéridos y ácidos grasos libres, donde se incluyen los productos de la hidrólisis), aumenta considerablemente el poder emulsificante de dichas sales (Verger, 1984).

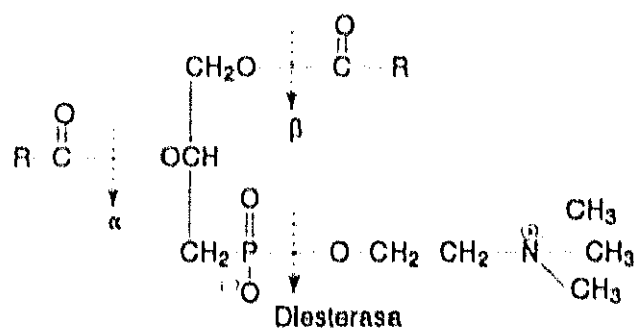
La hidrólisis se realiza con la ayuda de un cofactor llamado colipasa el cual es una proteína no enzimática que fue aislada por Maylié y col. en 1971.

La colipasa se segrega junto con la lipasa en el jugo pancreático. Dicha proteína es segregada como precursor, el cual es activado por ruptura, mediante tripsina, de un pentapéptido en su extremo N-terminal (Rathelot y col., 1981). Dicha ruptura provoca un aumento en la afinidad de unión entre lipasa y colipasa en presencia de sustrato. Por otro lado, se piensa que el pentapéptido liberado participa en la regulación del apetito (Erlanson-Albertsson y Larsson, 1988).

La importancia de la hidrólisis en el intestino delgado por medio de la lipasa pancreática es conocida desde hace muchos años (Artoum y Reale, 1935; Frazer y Sammons, 1945). Sin embargo no fue hasta 1952 cuando Mattson y col. demostraron la especificidad de dicha enzima para romper los enlaces de las posiciones α de los triglicéridos, siendo por ello los β -monoglicéridos y los ácidos grasos libres sus principales productos de ruptura.

Los fosfolípidos constituyen una fracción sustancial de los lípidos ingeridos. Su hidrólisis requiere la cooperación de tres enzimas: α -fosfolipasa que separa un ácido graso de la posición β del fosfolípido; β -fosfolipasa, que separa el ácido graso de la posición α y, finalmente, una diesterasa, dando lugar a glicerofosfato y colina.

Figura 21.- Hidrólisis de los fosfolípidos.



Los ésteres de colesterol son hidrolizados en el intestino por una colesterol esterasa. Monoglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol libres se absorben gracias a la presencia en el intestino de las sales biliares las cuales en condiciones fisiológicas y debido a su carácter anfipático, forman micelas mixtas con dichos productos y de esta forma son solubilizados en el jugo intestinal y absorbidos (Larralde, 1979).

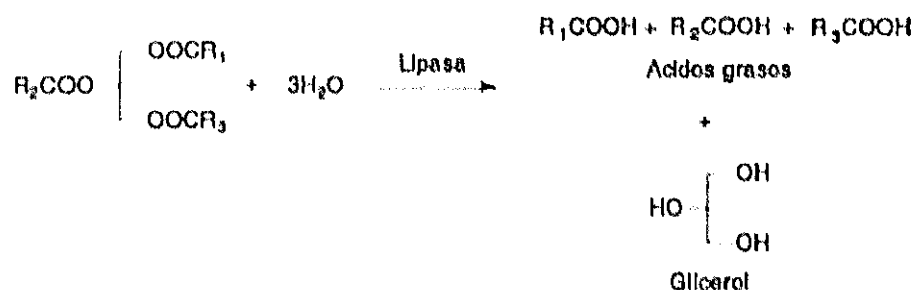
1.3.2 LIPASAS.

1.3.2.1 Definición.

Una primera definición de estas enzimas podría ser la siguiente:

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son un conjunto de enzimas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para dar lugar a ácidos grasos y glicerol. Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diglicéridos y monoglicéridos (Desnuelle, 1972; Florkin y Stoltz, 1964).

Figura 22.- Hidrólisis de los triglicéridos por medio de la lipasa pancreática.



Actualmente se puede decir que esta definición es incompleta puesto que:

1.- Sólo se ajusta a las enzimas no específicas como la de *Staphylococcus aureus* (Jensen, 1983), ya que hay lipasas entre las que se encuentra la lipasa pancreática (Desnuelle, 1961) que sólo hidrolizan las posiciones 1,3 del triglicérido. También hay otras, aunque las menos, que muestran preferencia por la posición 2 (Sugihara y col., 1991).

2.- Mediante el control de las condiciones de reacción, las lipasas son capaces de llevar a cabo la reacción inversa a la de su función biológica, es decir, sintetizar ésteres mediante procesos de esterificación, transesterificación e interesterificación (Macrae, 1983). Este tipo de procesos tienen muchas aplicaciones industriales; así por ejemplo, la interesterificación de triglicéridos de aceite de palma con ácido esteárico catalizada por la lipasa de *Rhizopus arrhizus*, se aplica industrialmente para la producción de manteca de cacao sintética (Mojovic y col., 1993).

3.- Las lipasas además, son capaces de hidrolizar otro tipo de enlaces como amido y tioéster (García y col., 1992; Frykman y col., 1993).

Debido a la baja solubilidad en agua de sus substratos naturales, las lipasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces ésteres en la interfase de una fase lipídica (que constituye el sustrato) y una fase acuosa donde está la enzima disuelta. Esta propiedad las diferencia de las esterasas (carboxil éster hidrolasas, EC 3.1.1.1), que hidrolizan preferentemente ésteres solubles en agua (Sarda y Desnuelle, 1958).

Introducción

Por tanto, la diferencia radica en el estado físico del sustrato, así, las lipasas actúan mucho mejor sobre sustratos organizados en partículas (emulsiones y micelas) que sobre moléculas aisladas en agua (Sémériva y Desnuelle, 1979; Verger, 1984).

Por otro lado, las lipasas se podrían describir como enzimas nucleofílicas mas débiles que las esterases ya que, éstas últimas, pueden hidrolizar un enlace éster simple en disolución acuosa donde el grupo carbonilo está rodeado de moléculas de agua. Las lipasas, sin embargo, necesitan para funcionar correctamente que el grupo carbonilo del sustrato se encuentre activado por grupos éster vecinos y además son demasiado débiles para atravesar la protección de un disolvente tan polar como el agua (Brockerhoff, 1968).

1.3.2.2 Clasificación de las lipasas.

Las lipasas, según su diferente origen dentro de la naturaleza, pueden dividirse en tres grupos (Wills, 1965).

1) Lipasas de origen animal.

Este tipo de enzimas existen en todos los órdenes. Dentro de los mamíferos se pueden distinguir tres subgrupos:

1.- Las lipasas descargadas en el tracto digestivo por órganos especializados (Deuel, 1955). A este tipo pertenece la lipasa pancreática objeto de nuestro estudio.

2.- Las lipasas tisulares, tales como las presentes en el corazón, arterias, cerebro, músculo, tejido adiposo, sangre, etc. (Datta y col., 1988).

3.- Las lipasas presentes en la leche (Bengtsson-Olivecrona y col., 1986; Reddy y col., 1986).

2) Lipasas de origen vegetal.

Se encuentran principalmente en semillas y frutos. Cuando una semilla germina presenta una alta actividad lipolítica, encaminada a obtener la energía necesaria para llevar a cabo dicho proceso. Por ello las enzimas mejor caracterizadas de este grupo se encuentran en el maíz, fruto de palma, trigo y avena.

3) Lipasas de origen microbiano.

Se encuentran en bacterias, hongos y levaduras. La mayor parte de ellas son lipasas exocelulares (una vez sintetizadas son excretadas a través de la membrana celular al medio de cultivo) y actualmente han recibido una gran atención por sus aplicaciones en la industria (Vic, 1990) y en el campo de la medicina (Mustranta, 1992).

1.3.3 EMULSIONES.

Una emulsión, de acuerdo con la definición clásica, es un sistema disperso heterogéneo de dos fases inmiscibles, donde ambas, la fase interna y la fase externa, son líquidas. El tamaño de partícula de la fase interna varía entre 0,5 y 100 μm . Una definición más moderna, adoptada por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), considera que una emulsión contiene gotas líquidas y/o cristales líquidos dispersos en un líquido (Bustamante Martínez, 1993).

Las emulsiones pueden ser oleo-acuosas (O/A) o acuo-oleosas (A/O) siendo la fase externa la que se indica detrás de la barra.

1.3.3.1 Formación de la emulsión.

Para favorecer la formación y estabilidad de las emulsiones se utilizan emulgentes, compuestos que se adsorben en la interfase líquida aceite-agua disminuyendo la tensión interfacial.

Los emulgentes más importantes son los tensioactivos, los coloides hidrófilos y ciertas partículas sólidas (Higuchi y col., 1989).

1) Tensioactivos.

Son sustancias con moléculas de naturaleza anfipática que forman una película monomolecular y flexible alrededor de la fase interna disminuyendo la tensión interfacial (del Pozo Carrascosa, 1993).

Introducción

La predicción general del comportamiento y propiedades físico-químicas de los tensioactivos se evalúa mediante el índice HLB (balance hidrófilo/lipófilo), que representa numéricamente el predominio de cada una de las partes (hidrófila y lipófila) de la molécula. Los emulgentes A/O presentan predominio del polo hidrófobo y en los O/A, por el contrario, predomina la fracción polar.

Tipos de tensioactivos:

i) Iónicos: Este tipo de tensioactivos forman además una doble capa cargada que hace que las gotas se repelan, previniendo la aproximación entre ellas. Pueden ser aniónicos, entre los que se encuentran las sales alcalinas de ácidos biliares, o catiónicos.

ii) No iónicos: No poseen carga y por ello son compatibles con los emulgentes aniónicos, catiónicos y anfóteros.

2) Coloides protectores.

Son sustancias hidrófilas (gomas y polímeros sintéticos) que se dispersan o se hinchan en agua formando soluciones coloidales. Estas sustancias forman una película multimolecular que protege la interfase. Tienen efecto estabilizante de emulsiones O/A ya que incrementan la viscosidad de la fase acuosa (Saunal y col., 1984).

3) Partículas sólidas.

Algunos sólidos finamente divididos se adsorben en la interfase y actúan como emulgentes. Si las partículas sólidas están cargadas proporcionan además una barrera eléctrica.

En la figura 23, aparece un cuadro resumen de los tipos de emulgentes.

El método de preparación de la emulsión, y diversos factores como la temperatura de las fases y el orden y velocidad de adición de las fases, influyen considerablemente en la distribución del tamaño de partícula de la fase interna, la viscosidad y la estabilidad (Barbé Rocabert y col., 1990b; Franco y col., 1994; Sagitani, H., 1981).

Figura 23.- Tipos de emulgentes

Tipo de emulgente	Tipo de película	Ejemplos	Tipo Emulsión	HLB ^a
Tensioactivos	Monomolecular	Aniónicos: estearatos, sulfatos Cationicos: bromuro de cetiltrimetilamonio No iónicos: derivados del sorbitano	O/A O/A O/A y A/O	12-40 30 3-17
Coloides hidrófilos	Multimolecular	Naturales: goma arábica, tragacanto Sintéticos: metilcelulosa	Favorecen O/A	8 13,2 10,5
Partículas sólidas	Película de partículas	Arcillas coloidales: Bentonita, Veegum Hidróxidos metálicos: Hidróxido de aluminio, Hidróxido de magnesio		

^a (Block, 1988; Chun y col., 1958)

I.3.3.2 Estabilidad de las emulsiones.

Durante la conservación de las emulsiones, se pueden dar diversos procesos como el cremado, floculación y/o coalescencia, que pueden conducir a la total separación de fases.

1) Cremado y sedimentación.

En las emulsiones O/A se puede presentar el cremado, es decir, el movimiento hacia arriba de las partículas de aceite de la fase interna, debido a que su densidad es inferior a la de la fase externa acuosa. La sedimentación es el proceso contrario que puede suceder en las emulsiones A/O.

La velocidad de cremado se puede reducir igualando la densidad de las fases, disminuyendo el tamaño de partículas o aumentando la viscosidad de la fase externa.

2) Floculación y coalescencia.

La floculación es la agregación de varias partículas, mientras que la coalescencia es la formación de una partícula de mayor tamaño por fusión de varias partículas. La floculación es reversible porque la película de tensioactivo permanece intacta, en tanto que la coalescencia es irreversible porque se destruye dicha película.

La floculación se puede prevenir incrementando la viscosidad del medio o mediante la adición de electrolitos y/o tensioactivos iónicos para aumentar la repulsión electrostática entre las partículas.

La coalescencia se puede prevenir con coloides protectores que forman capas multimoleculares alrededor de las partículas e incrementan la viscosidad de la fase externa, o añadiendo a la emulsión partículas sólidas que se adsorben en la interfase.

I.3.4 ESTRUCTURA DE LA LIPASA PANCREATICA.

I.3.4.1 Estructura primaria.

Tras su aislamiento y purificación a partir del páncreas (Marchis-Mouren y col., 1959; Vandermeers y col., 1974; Verger y col., 1969) se obtiene la enzima, la cual se ha

Introducción

visto que es una glicoproteína formada por una única cadena de 449 aminoácidos (De Caro y col., 1981). El peso molecular de la parte proteica es de 49,859 y el del azúcar de alrededor de 2.000 lo que hace que el total sea del orden de 52.000.

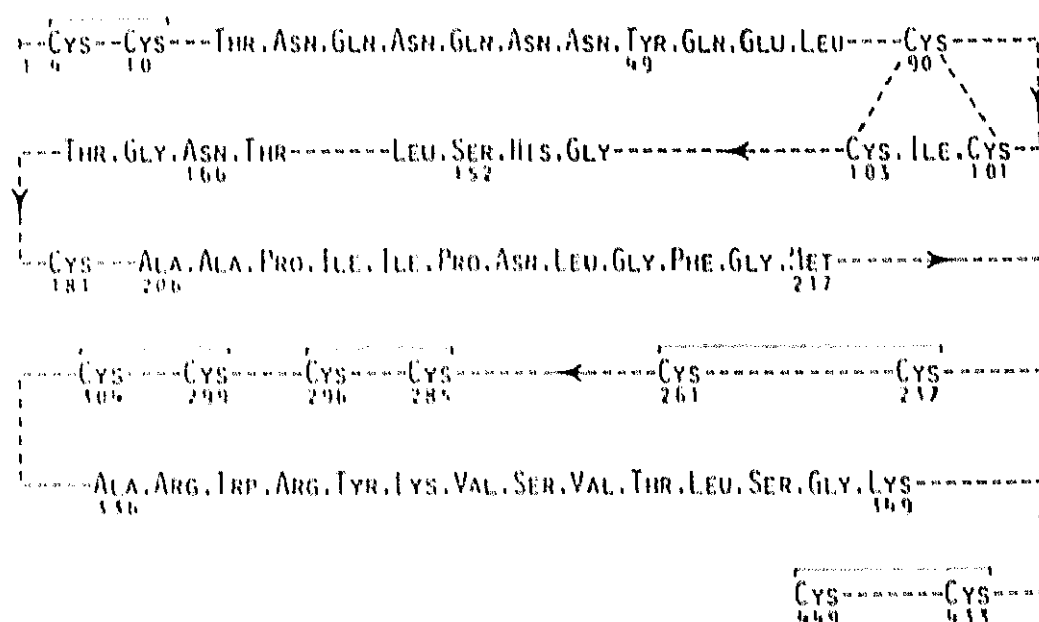
En la figura 24 aparece la secuencia completa de la lipasa pancreática porcina.

Figura 24.- Secuencia completa de la lipasa pancreática porcina.

1	50	100	150																										
Ser=	Glu=	Val=	Thr=	Phe=	Thr=	Arg=	Glu=	His=	Thr=	Phe=	Ser=	Arg=	Asp=	Ala=	Pro=	Tyr=	Ala=	Gly=	His=	Val=	His=	Arg=	Thr=	Asp=	His=	Val=	Leu=	Pro=	Thr=
Asp=	Lys=	Asp=	Val=	Asp=	Thr=	Arg=	Phe=	Leu=	Glu=	Tyr=	Thr=	Asn=	Gln=	Asn=	Gln=	Ala=	Asp=	Pro=	Ser=	Thr=	His=	Thr=	His=	Thr=	His=	Thr=	His=	Thr=	His=
Asn=	Ser=	Asn=	Thr=	Arg=	Met=	Asp=	Arg=	His=	Thr=	Arg=	Phe=	His=	His=	His=	Gly=	Phe=	His=	Asp=	His=	Gly=	Val=	Ala=	Asp=	Tyr=	Leu=	Ser=	Asn=	His=	Gly=
Lys=	Asn=	Leu=	Thr=	Lys=	Val=	Glu=	Ser=	Val=	Asn=	Gly=	Gly=	Val=	Asp=	Tyr=	Lys=	Gly=	Gly=	Val=	Arg=	Thr=	Gly=	Tyr=	Thr=	Gln=	Ala=	Ser=	Glu=	Asn=	His=
His=	Arg=	His=	Val=	Val=	Ala=	Glu=	Val=	Ala=	Tyr=	Phe=	Val=	Glu=	Val=	Leu=	Lys=	Ser=	Ser=	Leu=	Gly=	Tyr=	Val=	Thr=	Ser=	Asn=	Val=	His=	Val=	His=	Gly=
His=	Ser=	Leu=	Gly=	Ser=	His=	Ala=	Ala=	Gly=	Glu=	Ala=	Gly=	Arg=	Arg=	Thr=	Asn=	Gly=	Thr=	His=	Glu=	Arg=	His=	Thr=	Gly=	Leu=	Asp=	Pro=	Ala=	Glu=	Pro=
Cys=	Phe=	Gln=	Gly=	Thr=	Pro=	Gln=	Leu=	Val=	Arg=	Glu=	Asp=	Pro=	Ser=	Asp=	Ala=	Lys=	Phe=	Val=	Asp=	Val=	His=	Thr=	Asp=	Ala=	Ala=	Pro=	Glu=	Gln=	His=
Pro=	Asn=	Leu=	Gly=	Phe=	Gly=	Met=	Ser=	Gln=	Thr=	Val=	Gly=	His=	Leu=	Asp=	Phe=	Phe=	Pro=	Asn=	Gly=	Gly=	His=	Gln=	Met=	Pro=	Gly=	Gly=	Gln=	Lys=	Asn=
His=	Leu=	Ser=	Gln=	His=	Val=	Asp=	His=	Asp=	Gln=	His=	Tyr=	Arg=	Asp=	Phe=	Val=	Ala=	Cys=	Asn=	His=	Leu=	Arg=	Ser=	Tyr=	His=	Tyr=	Tyr=	Tyr=	Tyr=	Val=
Ala=	Asp=	Ser=	His=	Leu=	Asn=	Pro=	Asp=	Gly=	Phe=	Ala=	Gly=	Phe=	Tyr=	Leu=	Asp=	Ser=	Tyr=	Asn=	Val=	Phe=	Thr=	Ala=	Asn=	Val=	Gly=	Phe=	Pro=	Gly=	Pro=
Ser=	Glu=	Gly=	Val=	Pro=	Gln=	Met=	Gly=	His=	Tyr=	Ala=	Asp=	Arg=	Phe=	Pro=	Gly=	Lys=	Thr=	Asn=	Gly=	Val=	Ser=	Gln=	Val=	Phe=	Tyr=	Leu=	Asn=	Thr=	Gly=
Asp=	Ala=	Ser=	Asn=	Phe=	Ala=	Arg=	Tyr=	Arg=	Tyr=	Val=	Ser=	Val=	Thr=	Leu=	Ser=	Gly=	Lys=	Lys=	Val=	Thr=	Gly=	His=	Glu=	Leu=	Val=	Ser=	Leu=	Phe=	His=
Gly=	Asn=	Glu=	Gly=	Asn=	Ser=	Arg=	Gln=	Tyr=	Glu=	His=	Tyr=	Lys=	Gly=	Thr=	Leu=	Gln=	Pro=	Asp=	Asn=	Thr=	Ala=	Ser=	Asp=	Glu=	Phe=	Asp=	Ser=	Asp=	Val=
Glu=	Val=	Gly=	Asp=	Leu=	Gln=	Lys=	Val=	Leu=	Phe=	His=	Tyr=	Tyr=	Asn=	Asn=	Asn=	Val=	His=	Asn=	Pro=	Thr=	Leu=	Pro=	Arg=	Val=	Gly=	Ala=	Ser=	Lys=	His=
Thr=	Val=	Glu=	Arg=	Asn=	Asp=	Gly=	Lys=	Val=	Tyr=	Asp=	Phe=	Ser=	Ser=	Gln=	Glu=	Thr=	Val=	Arg=	Glu=	Gln=	Val=	Leu=	Leu=	Thr=	Leu=	Asn=	Pro=	Gly=	Val=

En la molécula hay 6 puentes disulfuro y 2 grupos sulthidrido libres. En la figura 25 aparece la representación esquemática de la cadena polipeptídica de la lipasa pancreática porcina mostrando la localización de los grupos sulthidrido y los puentes disulfuro (Benkouka y col., 1982).

Figura 25.- Características destacables de estructura primaria de la lipasa pancreática porcina.



La cisteína más reactiva se encuentra en la posición 181. Entre los tres residuos de cisteína situados en las posiciones 90, 101 y 103, se establece un puente disulfuro que puede unir a la Cys-90 con la Cys-101 o bien con la Cys-103, quedando la restante en cada caso como cisteína libre. Por ello, al menos en estado desnaturalizado, existen dos formas isoméricas de lipasa.

En conjunto, los puentes disulfuro forman pequeños bucles que proporcionan cierta flexibilidad a la cadena polipeptídica de lipasa.

En el polipéptido, hay dos segmentos de la cadena que merece la pena destacar; la región que va desde el resto 206 al 217, en la cual hay una sucesión de 11 aminoácidos hidrofóbicos interrumpida únicamente por la asparragina, y desde el resto 336 al 349, donde existe una alternancia regular de aminoácidos con diferente polaridad.

Existe gran similitud entre la lipasa pancreática de diversas especies, ya que se ha visto que la secuencia de la lipasa pancreática humana presenta un 85%, un 68% y un 82% de homología aminoacídica con las lipasas pancreáticas porcina, canina y equina respectivamente. En la figura 26 aparece la comparación de la secuencia de aminoácidos de las lipasas pancreáticas equina (Kerfelec y col., 1992), porcina (De Caro y col., 1981), humana (Lowe y col., 1989), de conejo (Aleman-Gomez y col., 1992) y de rata (Sims y col., 1992).

Figura 26.- Secuencia aminoacídica de lipasa pancreática equina, porcina, humana, de conejo y de rata. Los residuos conservados se indican mediante puntos. La numeración corresponde a la de la lipasa pancreática porcina. Los residuos de la triada catalítica aparecen con asteriscos, y la región de la "tapadera" se representa en cursiva.

```

1  NEVCYERLAC FSDDEPWAG-I VERPLKILPW SPEKVNTRFLL YTNEMPDNFO
   S...FPR... SDPA..A..I VQ..LRI..P -DKDVD..... Q.QN.Y.
   K...YER... SDDE..S..I TE..LHI..W -PKDVN..... E.PN.F.
   L...YER... GRRI..S.GT LE..FST..S TPKIVN..... E.PN.F.
   K...FDK... SDPA..S..T ID..LKA..W SPAQIN..... E.QD.Y.

51  EIVADPTTQ SDDEFTAKET RFTINGFIDK GRESWLSTMC QRMFKVESVN
   ELVA.P.T.T N...RMD... F..... D..SNI. K.L.K..S..
   EVAA.S.S.S G...KTN... F..... N..ANV. K.L.K..S..
   EISA.A.T.R G...RTP... F..... N..SNI. E.L.Q..T..
   KITS.A.S.R N...KTN... I..... N..SDM. K.M.K..S..

101 CIGVWKEKGN RTAYSQARON VRIVGAEVAY LGVLIQSEFD YSPSNVHIIG
   .....G.. TG.T..S.. I.L.....Y F.EV.K.SLG YS.S.V.V..
   .....G.. TG.T..S.. I.L.....Y F.EF.Q.AFG YS.S.V.V..
   .....G.. TT.P..T.. I.L.....Y L.GT.Q.SLG YS.S.I.V..
   .....G.. AT.T..T.. V.V.....L L.NV.K.DIG HP.D.V.L..

151 IDLASHAAGE AGKRTNGAVG RITGLDPAEP CFQGTPELVR LDPSDAQFVD
   ....S.A... A.R..N.TIE .....P.. C.....L.. ...S..K...
   ....A.A... A.R..N.TIG .....P.. C.....L.. ...S..K...
   ....A.A... V.R..N.TIG .....P.. Y.....I.. ...S..Q...
   ....S.V... A.K..F.AIG .....A... Y.....E.. ...T..Q...

201 VIHTDIAPFI DNLGFQMSQT AGHLDFPFG GKEMFGCQKN VLSQIVDIDG
   V...A..II .....T V..... .KQ...Q.. I.....D.
   V...A..IV .....V V..... .KQ...K.. I.....D.
   V...A..MV .....T V..... .KE...Q.. V.....N.
   A...A..II .....T V..... .NR...Q.. I.....D.

251 IKQSTRPFAD CNILISYKYY TDSILNPKAF AGFSCASYSO FTANKCFICS
   I.E.....V. ....A...L..D.. A..P.D..NV .T.....P
   I.E.....A. ....T...V..D.. A..P.A..NV .T.....P
   V.E.....V. ....A...V..N.. A..S.A..TA .S.....
   I.E.....A. ....T...V..T.. S..S.S..NV .S.....G

301 SEGETQMGHY ADRFPAWTKG VQQLFYLNIG DASNFARWRY RVDVTLSGKK
   .E..... .RFNGK.NG VS.V...N.. .A..... K.S....KK
   .G..... .RYNGK.ND VG.K...D.. .A..... K.S....KK
   .N..... .RFNRK.IG VG.T...N.. .S..... Q.A....RR
   .E..... .KYNGK.RE LY.K...N.. .K..... Q.T....OK

351 VTGHVIVSLF GNRKNGRQYE IFQGTLRPDN TYNEFDSDV EVGDLKVKF
   ....I....F .NR...R... IYK.T.Q.DN .HSD.....V E...LQK...
   ....I....F .NR...K... IFK.T.K.DS .HSN.....V D...LQH...
   ....V....Y .SK...K... IFT.L.K.GD .HLN.....V D...VQK...
   ....I....L .NG...K... VFK.S.H.GD .HVK.....H D...LOK...

401 IWYNN VINI TLPEVGAS-KI TVERNGGSVF NRCSEKTVRE DWLLTITAC horse
   I...N...P ...H....K. T..R.D.KVY D...QE.... EV....NP. pig
   I...N...P ...H....K. I..T.V.KQF N...PE.... EV....TP. human
   V...N...P ...K....Q. T..Q.D.RVF K...TD.... DI....TP. rabbit
   I...N...P ...K....AR. S..R.D.RVF N...QD.... DV....SA. rat

```

En la cadena polipeptídica hay una serie de residuos que merece la pena destacar:

Tyr-49: No es un residuo esencial, y reacciona con fluorofosfato de diisopropilo concentrado que es un inhibidor de serín esterasas.

Ser-152: Reacciona selectivamente con fosfato de dietil-p-nitrofenilo micelar y participa probablemente en la fijación de la enzima a la interfase. Este residuo es el que realiza el ataque nucleófilo sobre el grupo carbonilo del éster, reacción en la que se basa la lipólisis. La Ser-152 está unida mediante puentes de hidrógeno a His-263 la cual se une también mediante puentes de hidrógeno a Asp-176. Estos 3 aminoácidos forman la triada catalítica. Esta triada es semejante a la de las enzimas serín esterasas (Brady y col., 1990).

Phe-77 y Leu-153: Estos dos aminoácidos forman parte del hueco oxianiónico que, como se verá más adelante, es muy importante durante la catálisis.

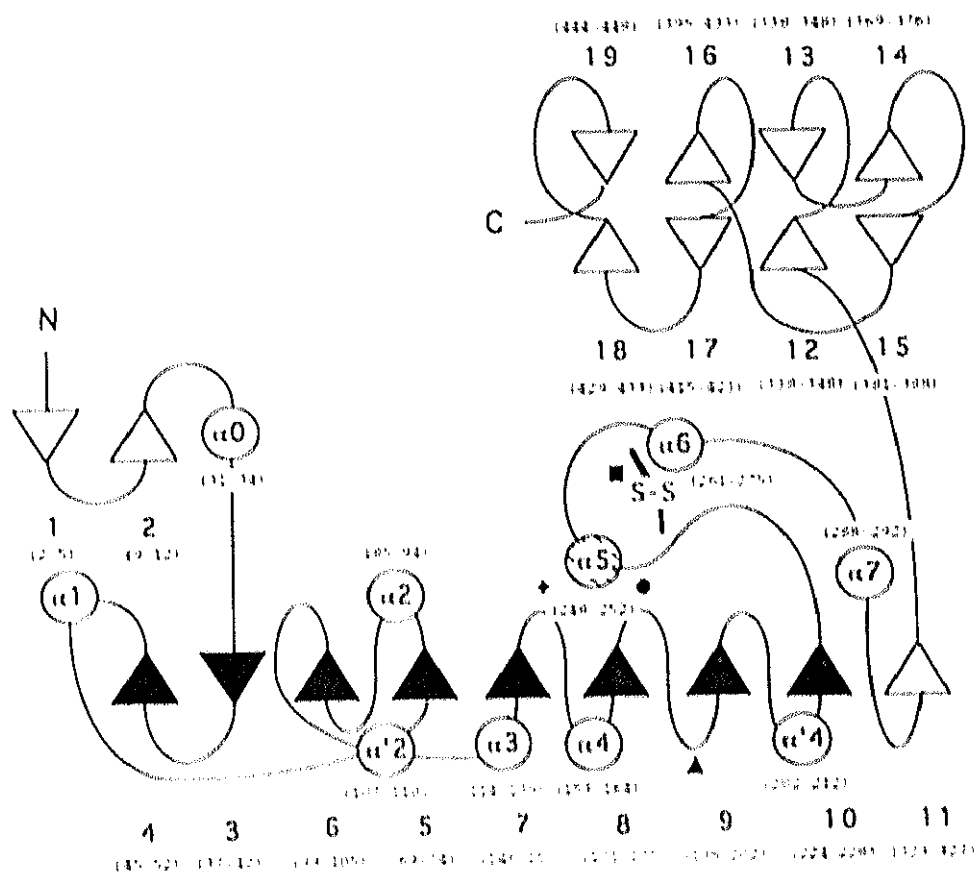
Asn-166: La cadena de azúcar se une a dicho residuo. Muchas isolipasas difieren en el hidrato de carbono que contienen (Fournet y col., 1987). El papel de la cadena de azúcar no parece ser esencial ya que en algunas especies no existe, p.e., en la lipasa pancreática de caballo (Kerfelec y col., 1992).

Un segmento de 9 residuos fundamentalmente hidrófobos y la secuencia Gly-X-Ser-X-Gly llamada secuencia de consenso, se han encontrado en todas las moléculas de lipasas de mamíferos y microbianas (Kordel y col., 1991). En las lipasas pancreáticas humana y porcina la secuencia correspondiente es: Val-His-Val-Ile-Gly-His-Ser-Leu-Gly (residuos 146-154). En esta secuencia está incluida la Ser-152.

1.3.4.2 Estructura secundaria.

La cadena polipeptídica posee dos unidades con diferente plegamiento. En la figura 27 aparece un esquema de la estructura secundaria de la lipasa pancreática (Bourne y col., 1994).

Figura 27.- Estructura secundaria de lipasa pancreática. Los triángulos negros representan los plegamientos α/β y los triángulos blancos representan láminas β .



- Dominio N-terminal (residuos 1-336). Tiene una típica estructura α/β dominada por una lámina β paralela central rodeada por α -hélices. La estructura α -helicoidal, tan sólo es adoptada por el 5% de la cadena polipeptídica de la lipasa (Verger, 1984).

En esta región se encuentra la triada catalítica (Ser, His y Asp), que constituye el centro activo, y una serie de aminoácidos cuya misión es estabilizar los oxianiones formados durante la catálisis. La Ser-152 está localizada en la curva de una horquilla entre una lámina β y una α -hélice, los dos residuos restantes de la triada catalítica, Asp-176 y His-263 se encuentran a un lado de la serina, mientras que, los residuos que constituyen el hueco oxianiónico, Phe-77 y Leu-153 están situados en el lado contrario. Uno de los aminoácidos que forman el hueco oxianiónico es el que sigue a la serina catalítica mientras que el otro se encuentra en un bucle diferente (Kazlauskas, 1994). En las lipasas, a diferencia de las serín esterases clásicas, esta zona es inaccesible al disolvente y sustratos ya que está cubierta por una hélice antifilica que forma parte de un bucle especial de la molécula llamado "tapadera" y que abarca desde el aminoácido Cys-237 hasta Cys-261 (Winkler y col., 1990). Esta

Introducción

estructura está estabilizada mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Brady y col., 1990).

- Dominio C'-terminal (residuos 337-449). Está formado por dos capas de lámina β las cuales contienen 4 hebras antiparalelas cada una.

En esta región se encuentra el lugar de unión con el cofactor colipasa (Chapus y col., 1988).

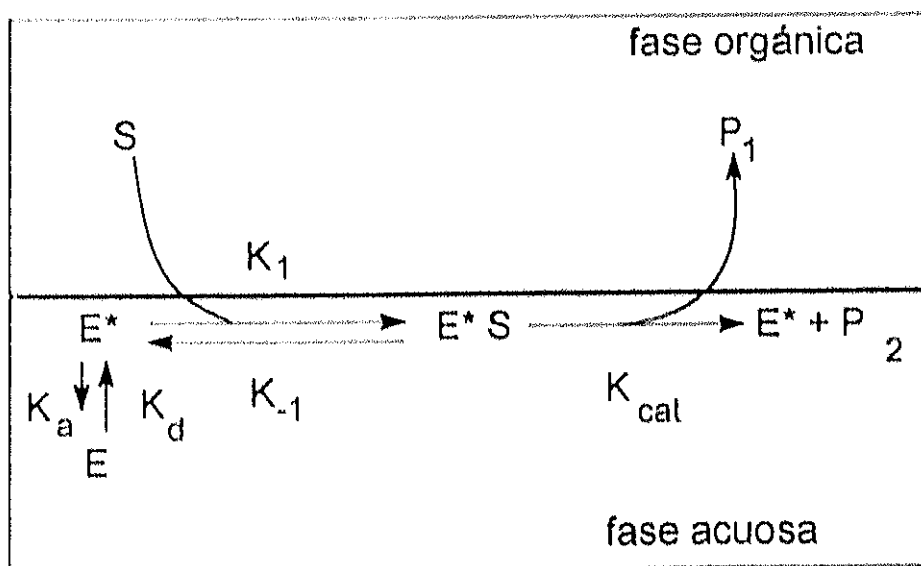
En el dominio C'-terminal de la lipasa pancreática existe un centro activo secundario responsable de la hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo, un sustrato soluble en agua (De Caro, 1986). Este centro activo secundario está formado por los residuos Lys-373 y His-354.

I.3.5 MECANISMO DE LA LIPOLISIS.

Las lipasas se caracterizan porque son enzimas que actúan en las interfases lípido-agua (Brockman y col., 1988). Durante la hidrólisis de los sustratos se producen tres procesos diferentes que son: adsorción de la enzima a la interfase, activación interfacial y catálisis propiamente dicha (Sémériva y Desnuelle, 1979).

Una representación esquemática de la acción de lipasas en interfases puede ser la que aparece en la figura 28 (Kierkels y col., 1994).

Figura 28.- Mecanismo de actuación de las lipasas en interfases.



La enzima, que se encuentra en medio acuoso, es capaz de penetrar en la interfase formada por el sustrato lipófilo y el agua. Cuando enzima y sustrato se encuentran en la interfase, la enzima se adsorbe reversiblemente a este último y forma un complejo enzima-sustrato que más tarde libera los productos y regenera la enzima.

I.3.5.1 Adsorción interfacial.

La propiedad de adsorberse a las interfases la presentan todas las proteínas en general (Sémériva y Desnuelle, 1979).

La adsorción de la lipasa en la interfase es el primer paso para que se produzca la reacción, ya que se ha comprobado que la actividad lipásica depende directamente de la cantidad de enzima adsorbida en la interfase (Rathelot y col., 1981). Por ello, un factor muy importante de la lipólisis es el estado de dispersión del sustrato.

I.3.5.1.1 SUSTRATOS EMULSIONADOS.

La emulsión de los sustratos hace que posean una mayor superficie interfacial. Hay dos parámetros de las emulsiones que pueden variar:

- Número de partículas con una distribución de tamaño determinada en un volumen dado que es la llamada "concentración de la emulsión".
- Tamaño medio de las partículas para una concentración dada.

La mayoría de los triglicéridos naturales, sustratos biológicos de la lipasa, tienen propiedades hidrofóbicas debido a la presencia de cadenas alifáticas con 14-18 átomos de carbono. Estos originan emulsiones compuestas de partículas esféricas de tamaño variable. Por el contrario, los triglicéridos de cadena corta poseen una solubilidad distinta debido a su mayor hidrofilia, por lo que se encuentran en forma de monómeros a bajas concentraciones; sin embargo, en soluciones más concentradas, estos compuestos se organizan en micelas.

Se ha comprobado que la actividad de la lipasa frente a triglicéridos solubles en agua, se incrementa considerablemente cuando la concentración de éstos se encuentra por encima de su punto de saturación, es decir, cuando se ha superado el límite de solubilidad de dichos compuestos en agua (Sémériva y Desnuelle, 1979; Verger, 1984).

El comportamiento peculiar de la lipasa pancreática no sólo se limita a emulsiones. Entressangles y Desnuelle (1968) observaron que en disoluciones homogéneas de triglicéridos de cadena corta que contenían NaCl, se formaron pequeños agregados micelares sobre los cuales la lipasa mostró una velocidad máxima de hidrólisis, similar a la registrada para el mismo sustrato en estado emulsionado.

Esta idea se ve confirmada por el hecho de que los sustratos solubles en agua ven aumentada su lipólisis en presencia de interfases inertes (Uçar y col., 1989). Brockman y col. (1973) realizando hidrólisis de tripropionina, sustrato parcialmente soluble, con lipasa pancreática porcina, registraron un incremento de hasta mil veces en la velocidad de hidrólisis en presencia de bolitas de vidrio siliconizadas. La interpretación dada por estos investigadores es que se forma una monocapa esférica de glicéridos alrededor de las bolitas, que da lugar a un incremento de la superficie interfacial similar al producido en las emulsiones o las micelas.

Sin embargo, no es sólo importante el área de la interfase ya que se ha visto que la velocidad de reacción lipolítica en sistemas heterogéneos se ve muy afectada, para un área constante, por las características físico-químicas de la superficie lipídica (van Tilbeurgh, 1992). La adsorción interfacial de la lipasa pancreática depende en gran medida de este factor denominado "calidad" de la interfase (Verger y de Haas, 1976).

En las interfases que poseen fosfolípidos en su estructura, se pueden producir interacciones lípido-lípido entre fosfolípidos y sustratos y productos que regulan en gran medida las interacciones enzima-superficie. Como esta interacción se ha visto que es esencial para la actividad de las lipasas solubles en agua, esta regulación es muy importante en el control del proceso catalítico (Brockman y col., 1988).

La mayor actividad de lipasa frente a sustratos emulsionados llevó a la conclusión de que en la enzima existe una zona de reconocimiento de interfase que es diferente topográficamente del centro activo catalítico (Chapus y col., 1988).

1.3.5.2 Activación interfacial.

La actividad catalítica de las lipasas se incrementa significativamente en presencia de interfases aceite-agua; este fenómeno se denomina activación interfacial (Brockman, 1984) y es conocido desde hace tiempo, pero sin embargo, las bases moleculares de este proceso no están resueltas totalmente.

Existen dos teorías que intentan explicar este fenómeno: teoría del sustrato y teoría de la enzima.

1) Teoría del sustrato (Brockerhoff, 1968; Brockman y col., 1973).

Dicha teoría atribuye la activación interfacial a la concentración y organización de las moléculas del sustrato en la interfase, denominada "calidad interfacial" (Deckelbaum y col., 1990; Muderhwa y Brockman, 1992; Wilcox y col., 1993).

Un procedimiento muy adecuado para el seguimiento de la activación interfacial, consiste en realizar estudios cinéticos sobre sustratos organizados en capas monomoleculares. Para ello, se realiza la extensión de los lípidos sobre un soporte acuoso o salino, de tal forma que se obtenga una monocapa de dichos lípidos en éste último. A continuación se inyecta la enzima en el soporte para que comience la reacción (Alsina y col., 1989; Queraltó Moreno y col., 1982a).

Estas técnicas presentan muchas ventajas sobre los métodos convencionales, pudiendo citar entre otras:

1.- Proporcionan una interfase estable sin necesidad de añadir sustancias anfífilas al medio.

2.- Son muy sensibles, por lo que se necesitan cantidades mínimas de lípidos para realizar medidas cinéticas.

3.- Permiten el control de parámetros físico-químicos característicos de la película monomolecular, aportando información sobre el curso de la reacción.

4.- Proporcionan la posibilidad de variar la "calidad de la interfase" que viene determinada por la naturaleza de los lípidos que forman la monocapa, orientación y conformación de las moléculas, carga, viscosidad, etc.

De esta forma, mediante este tipo de estudios, se ha visto que la distribución lateral de los lípidos en la superficie de los sustratos (Alsina y col., 1989; Muderhwa y Broekman, 1992; Queraltó Moreno y col., 1982b), no sólo regula la adsorción de la lipasa desde el medio acuoso hacia éstos, sino que influye también sobre la accesibilidad de dichos sustratos hacia las lipasas adsorbidas y, por consiguiente, sobre la hidrólisis enzimática.

2) **Teoría de la enzima.** Postula que como consecuencia de la adsorción a la interfase, la enzima sufre cambios en su conformación a raíz de los cuales, se hace catalíticamente más activa (Desnuelle y col., 1960). Las bases para la teoría de la enzima se han obtenido recientemente gracias a estudios cristalográficos, mediante rayos X, realizados sobre lipasa pancreática (Bourne y col., 1994; Winkler y col., 1990; van Tilbeurgh y col., 1992) y otras lipasas fúngicas (Brzozowski y col., 1991; Derewenda y col., 1992; Grochulski y col., 1993; Schrag y col., 1991) y microbianas (Noble y col., 1993).

En términos generales, y a pesar de las diferencias existentes entre las distintas lipasas, las consecuencias funcionales de los cambios producidos son muy similares (Derewenda y col., 1994; Verger y col., 1994):

1.- El sustrato puede acceder al centro activo que, de otro modo, permanecería "oculto" por un bucle especial de la molécula de lipasa denominado "tapadera", el cual, impide la lipólisis cuando la enzima se encuentra en solución.

2.- Se forma el hueco oxianiónico que es crítico para la estabilización de intermedios tetrahédricos formados durante la catálisis.

3.- Creación de una superficie no polar en la entrada del centro activo, la cual es la zona de unión a la interfase lipídica.

4.- Y en el caso de lipasa pancreática, reforzamiento de la unión a la colipasa.

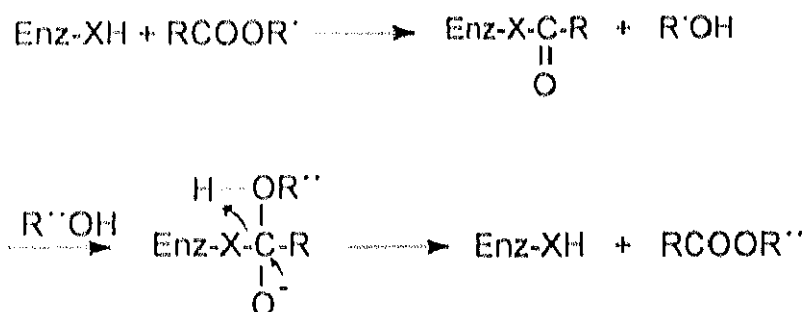
En la teoría enzimática, por tanto, se introduce el modelo de los dos estados (Brady y col., 1990; Derewenda y col., 1994), según el cual la enzima puede presentar dos conformaciones distintas dependiendo de que se encuentre, o no, en la presencia de una interfase aceite-agua. La conformación "cerrada" es estable en medio acuoso y se caracteriza porque los centros activos se encuentran inaccesibles a los sustratos solubles en agua.

Estas dos teorías no son excluyentes la una de la otra por lo que autores como Derewenda y col. (1994), proponen que la activación interfacial tiene tanto un componente enzimático como del sustrato, y que los cambios conformacionales producidos en la enzima son esenciales, pero no suficientes, para la expresión de máxima actividad que manifiestan las lipasas que sufren el proceso de activación.

1.3.5.3 Catálisis.

La hidrólisis propiamente dicha se produce a través de un ataque nucleófilo de la Ser-152 al grupo éster, tras lo cual se forma un intermedio acil-enzima que posteriormente da lugar al ácido graso libre y a la enzima regenerada (Sémériva y Desnuelle, 1979) al reaccionar con H_2O (hidrólisis) o una molécula de alcohol (alcoholisis). En la figura 29, aparece el mecanismo de reacción de lipasa propuesto por estudios cinéticos (Chen y col., 1982, 1987; Deleuze y col., 1987; Zaks y Klivanov, 1985).

Figura 29.- Mecanismo de reacción de la lipasa.



La inhibición competitiva de la lipasa por medio de los ácidos de boro, los cuales se comportan como análogos del estado tetrahédrico de transición en serín proteasas, llevó a la conclusión de que la reacción catalizada por la lipasa, probablemente tenía lugar por medio de este tipo de mecanismo, como sucede en serín proteasas (Rotanova y col., 1976).

La reacción hidrolítica se termina mediante la deacilación del centro activo de la lipasa (Kawase y col., 1992).

En el caso de sustratos solubles como el acetato de p-nitrofenilo, la hidrólisis se produce más lentamente que en sustratos emulsionados (Chapus y col., 1976). Para esos sustratos, la deacilación es el paso limitante de la velocidad de hidrólisis, si bien se acelera en presencia de interfases. Por otro lado, el acetato de p-nitrofenilo puede ser hidrolizado además por el dominio C-terminal de la lipasa, pero en este caso la velocidad de reacción no se ve afectada por la presencia de interfases aceite-agua.

1.3.6 RELACION MECANISMO DE ACCION-ESTRUCTURA DE LA PROTEINA.

Las lipasas pancreáticas están formadas por dos dominios distintos mientras que las lipasas fúngicas sólo poseen uno. Esta organización en dos dominios está relacionada con las condiciones fisiológicas particulares de la digestión de la grasa en vertebrados. Debido a la presencia de sales biliares, las cuales son altamente inhibitorias de la lipasa pancreática (Borgström y Erlanson, 1973), dichas enzimas requieren la presencia de un cofactor, la colipasa, para adsorberse sobre la capa de sales biliares que rodea a la interfase lipoaqueosa (Chapus y col., 1975; Vandermeers y col., 1975). El dominio N-terminal, que representa 2/3 de la molécula, está dedicado a la catálisis mientras que el C-terminal es responsable de la unión a la colipasa (Aboushalam y col., 1992; Chaillan y col., 1992).

Las lipasas poseen en su centro activo la típica triada catalítica de serín proteasas formada por Ser, His y Asp (Cilu en el caso de *G. candidum*). En la lipasa pancreática estos residuos se corresponden con Ser-152, His-263 y Asp-176.

1.3.6.1 Modificaciones químicas del centro activo.

La intervención de histidina como residuo esencial en el centro activo de lipasa se apoya mediante:

Introducción

- Experimentos de fotooxidación en la presencia de un indicador (Sémériva y col., 1971; Sternby y col., 1984).

- Tratamiento químico de las enzimas mediante pirocarbonato de dietilo (Chapus y Sémériva, 1976). Esta es una reacción muy específica y en ella se forma un derivado carbetoxi de la enzima (CE-lipasa) en el cual están involucrados únicamente tres residuos de histidina.

En ambos casos, se ven afectados los residuos de histidina de la molécula de la lipasa y la enzima pierde su actividad lipolítica frente a, tanto sustratos solubles como emulsionados, pero sin embargo mantiene su capacidad de adsorberse a interfases inertes.

La modificación de cinco grupos carboxílicos de la lipasa mediante reacción con carbodiimida (5N-lipasa) (Chapus y Sémériva, 1976) inhibe la actividad de dicha enzima frente a sustratos emulsionados, pero sin embargo no afecta a la lipólisis de sustratos monoméricos (acetato de p-nitrofenilo y triacetina) ni a la adsorción de lipasa a un modelo de interfase.

La Serina-152 se encuentra dentro de la secuencia Gly-His-Ser-Leu-Gly. Este residuo no es capaz de reaccionar con organofosfatos disueltos tales como fluorofosfato de diisopropilo y fosfato de dietil-p-nitrofenilo; sin embargo, si éstos están emulsionados o forman micelas mixtas con sales biliares, la enzima reacciona con ellos. La lipasa modificada (DEP-lipasa) no tiene actividad frente a sustratos emulsionados pero sí puede hidrolizar sustratos solubles (en presencia de pequeñas cantidades de acetonitrilo). Por otro lado, esta modificación de lipasa, la incapacita para adsorberse a interfases inertes (Chapus y Sémériva, 1976). El hecho de que DEP-lipasa sea capaz de hidrolizar sustratos solubles como acetato de p-nitro fenilo (disuelto en acetonitrilo al 4%), implica que este compuesto y el fosfato de dietil-p-nitrofenilo, a pesar de su similitud estructural, no reaccionen con el mismo lugar en la enzima (Verger, 1984). Esta observación hizo pensar que el residuo de serina únicamente estaba relacionado con la zona de reconocimiento de interfases.

Los estudios químicos realizados sobre lipasa pancreática, demostraron la existencia de tres residuos esenciales relacionados, así mismo, con las tres fases principales de la reacción lipolítica: adsorción interfacial (serina), activación interfacial (aspártico) y catálisis (histidina) (Chapus y col., 1976; Sémériva y Desnuelle, 1979).

Como consecuencia de las modificaciones químicas de la enzima, se llegó a la conclusión de que la lipasa posee dos lugares funcionalmente importantes y topográficamente diferentes:

- Centro catalítico, donde participan His y otros aminoácidos.
- Centro de reconocimiento de la interfase, controlado por Ser-152.

1.3.6.2 Estudios tridimensionales de las lipasas.

Los estudios cristalográficos, mediante rayos X, han permitido conocer la estructura tridimensional de las lipasas y confirmar que sus centros activos están formados por triadas similares a las de las serín proteasas, así como verificar la aparición de una serie de cambios conformacionales en la enzima asociados con la activación interfacial.

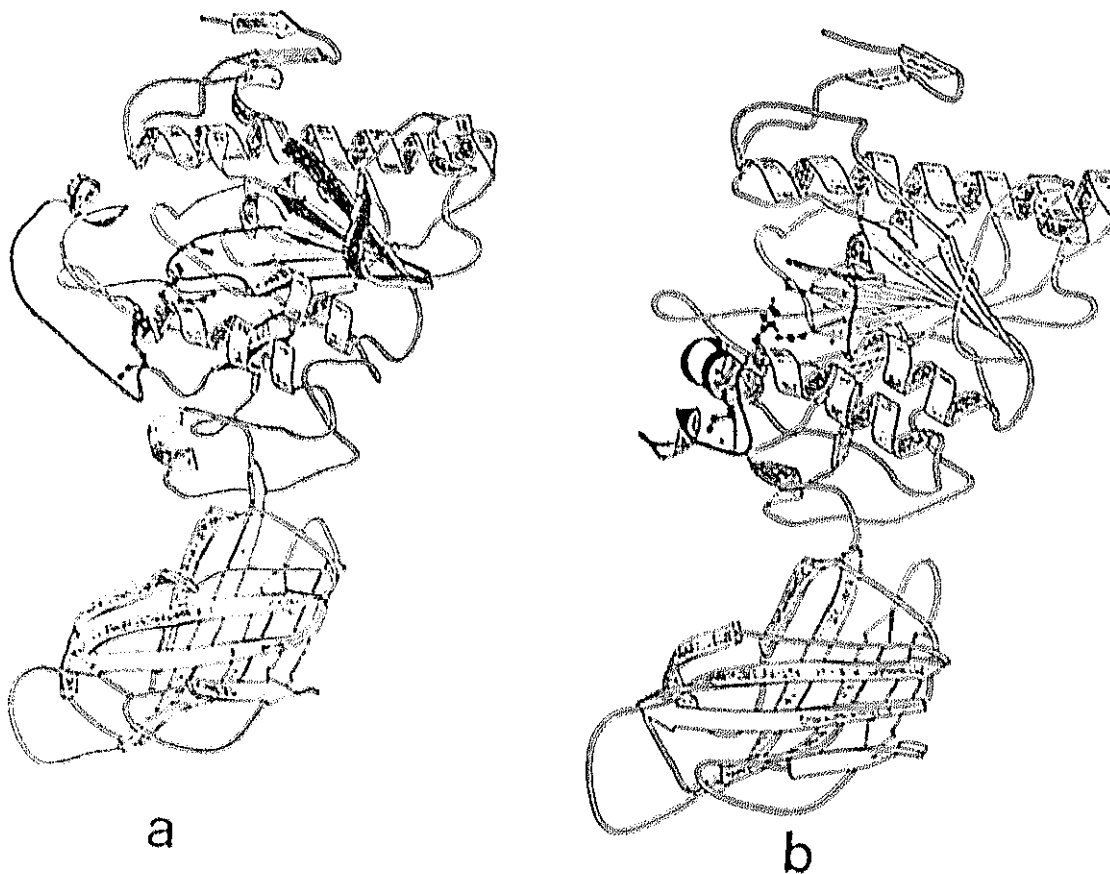
El centro activo de las lipasas, a diferencia de las serín esterases, no es accesible a los sustratos y al solvente ya que en medio acuoso permanece "oculto" por un bucle especial de la molécula llamado "tapadera". En presencia de interfases, se producen numerosos cambios en la estructura secundaria y terciaria de la región que rodea al centro activo (Verger y col., 1994). La "tapadera", especialmente, adopta una conformación totalmente diferente que permite que los sustratos puedan entrar en contacto con el centro activo (Derewenda y col., 1994; Winkler y col., 1990).

La conformación variable de la "tapadera" muestra como una misma secuencia de aminoácidos puede adoptar diferentes estructuras secundarias dependiendo de su entorno físico-químico (Verger y col., 1994).

Las lipasas por ello pueden presentar dos conformaciones diferentes en función del medio: una forma "cerrada" en solución acuosa y otra forma "abierta" en presencia de interfases aceite-agua, como se puede observar en la figura 30.

Sin embargo, se ha observado que incluso en ausencia de una verdadera interfase aceite-agua, existe un sutil equilibrio entre las dos conformaciones de la enzima (Derewenda y col., 1994). El hecho de que la lipasa sea capaz de hidrolizar sustratos monoméricos implica que, incluso en solución, la movilidad de la "tapadera" en la forma "cerrada" de dicha enzima es suficiente para permitir que pequeñas moléculas accedan al centro activo (Bourne y col., 1994).

Figura 30.- Comparación entre las formas "cerrada" (a) y "abierta" (b), de la lipasa pancreática.

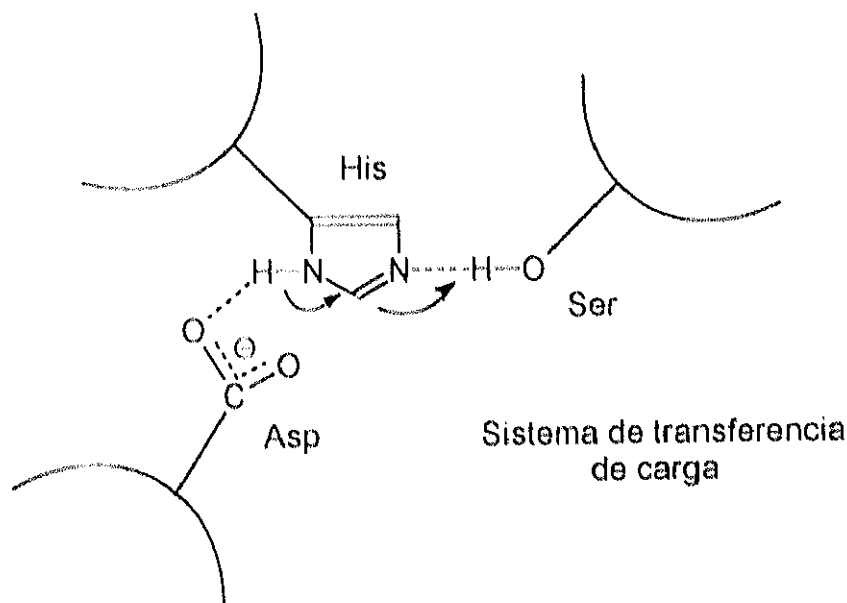


1.3.6.3 Mecanismo de la reacción.

La reacción hidrolítica catalizada por la lipasa pancreática tiene lugar por medio del ataque nucleófilo del residuo de Ser-152 del centro activo sobre el grupo carbonilo del éster.

Las interacciones producidas entre el residuo de Ser-152 y los residuos de His-263 y Asp-176 (triada catalítica), facilitan la ionización del grupo hidroxilo de este aminoácido ($-OH \rightleftharpoons -O^- + H^+$) produciéndose la activación de dicho residuo nucleófilo mediante un sistema de transferencia de carga (Kawase y col., 1992). En la figura 31 se representa esquemáticamente el sistema de transferencia de carga de la triada catalítica.

Figura 31.- Mecanismo de la lipólisis. Sistema de transferencia de carga de la triada catalítica.



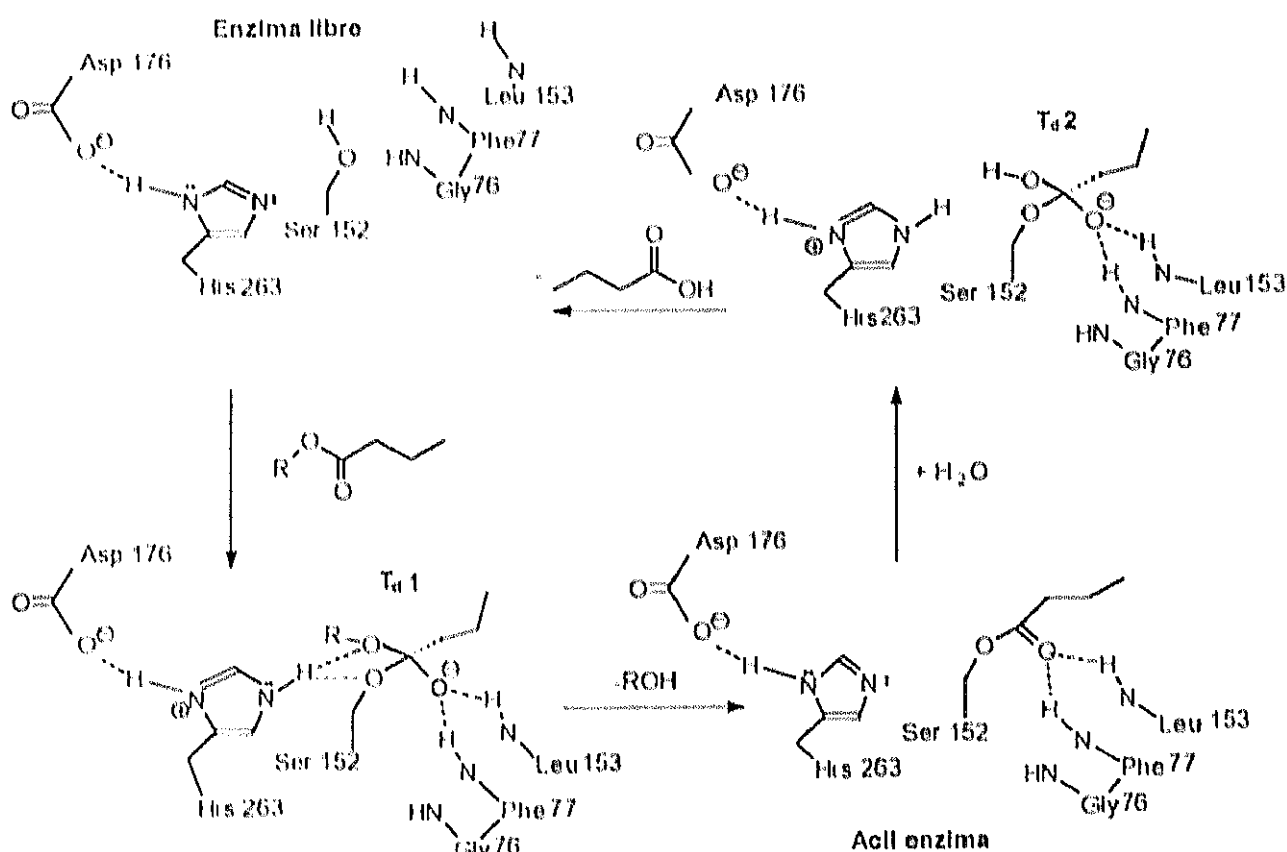
Durante la catálisis, se produce un complejo acil-enzima cuya formación y destrucción tiene lugar a través de intermedios tetrahédricos (Grochulski y col., 1994). En la figura 32 se representa la hidrólisis de un éster butírico catalizada por la lipasa pancreática (modificación del esquema que aparece en: Kazlauskas, 1994). En dicho esquema aparecen los residuos que forman la triada catalítica, así como los residuos Phe-77 y Leu-153 que estabilizan mediante puentes de hidrógeno los oxaniones formados en los intermedios tetrahédricos. La acilación de la enzima se produce como consecuencia del ataque nucleófilo realizado sobre el éster por el residuo de Ser-152 de la triada catalítica; el intermedio tetrahédrico producido en dicha reacción es el denominado T_d1 . La deacilación de la enzima es el resultado de ataque nucleófilo realizado sobre el complejo acil-enzima por una molécula de agua, en este caso el intermedio tetrahédrico se ha denominado T_d2 .

Un estado de transición próximo a T_d1 determinaría la selectividad de la lipasa hacia los alcoholes, puesto que la molécula de alcohol se elimina en primer lugar al formarse el complejo acil-enzima (Kazlauskas, 1994). La selectividad de la lipasa hacia los ácidos carboxílicos que forman el éster vendría determinada por los dos estados de transición T_d1

Introducción

y T_d2 ya que en ambos intermedios participa la molécula del ácido carboxílico. Por consiguiente, la selectividad de la lipasa frente a los ácidos carboxílicos podría depender de si la formación o la destrucción del complejo acil-enzima fuera el paso limitante de la velocidad de reacción (Kazlauskas, 1994).

Figura 32.- Mecanismo de la lipólisis. Hidrólisis de éster butírico mediante lipasa pancreática porcina.



La hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo, sustrato soluble en agua (De Caro y col., 1986) por medio de la lipasa pancreática, tiene lugar principalmente en el centro activo. Sin embargo, se pueden producir reacciones secundarias que implican la acetilación irreversible de un residuo de lisina localizado en el dominio C-terminal de dicha enzima (Kerfelec y col., 1992). Los residuos Lis-373 y His-354 forman el centro activo secundario situado en el dominio C-terminal y responsable de la hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo.

El lugar de unión al cofactor colipasa está localizado en el dominio C-terminal de la molécula de lipasa (Mahé-Gouhier y Léger, 1988; Aboushalam y col., 1992; Chaillan y col., 1992).

Los estudios cristalográficos del complejo lipasa-colipasa (van Tilbeurgh y col., 1992, 1993) indican que la unión del cofactor a la enzima tiene lugar a través de dos sitios, uno se encuentra en el dominio C-terminal y existe ya de antemano, y otro se crea por el reposicionamiento de la "tapadera" en presencia de interfases y está localizado en el dominio N-terminal. Dicha unión se produce a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Erlanson y col., 1977).

1.3.7 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS.

Las lipasas son enzimas selectivas en la hidrólisis de sustratos (Sonnet, 1988; Sonnet y Gazzillo, 1991). La especificidad de la lipasa pancreática sobre sustratos se manifiesta tanto a nivel de la molécula del alcohol como de la del ácido graso esterificado.

- Alcohol.

Las hidrólisis de ésteres catalizadas por la lipasa pancreática se ven afectadas por la naturaleza del alcohol, encontrándose 2 factores que afectan en la velocidad de reacción como son el efecto inductivo y el impedimento estérico (Brockerhoff, 1968).

1) La presencia de sustratos electrófilos en la molécula del alcohol favorecen la lipólisis, como era de esperar, ya que es una reacción basada en un ataque nucleófilo sobre el grupo carbonílico del éster.

2) Los alcoholes cuya molécula es de gran volumen inhiben la lipólisis. El efecto estérico explica el hecho de que la lipasa pancreática presente especificidad por las posiciones 1,3 de la molécula del triglicérido.

La hidrólisis también está influenciada por el hecho de que los ésteres sean de monoalcoholes o de glicerol. En general, en condiciones similares, los alquil ésteres son hidrolizados mucho más lentamente que los triacilgliceroles correspondientes (Desnuelle, 1961; Savary, 1972).

- Ácido graso.

La naturaleza de las moléculas de los ácidos grasos influye sobre la velocidad de hidrólisis. En dicha influencia intervienen distintos factores:

1) Longitud de la cadena y existencia de dobles enlaces.

Bottino y col. (1967), afirmaron que los ácidos grasos insaturados con dobles enlaces cercanos al grupo carboxílico, son resistentes al ataque por lipasa pancreática. Esto mismo fue confirmado por Brockerhoff (1970) y Helmermann y col. (1973).

Las velocidades relativas de hidrólisis de diferentes ácidos grasos dependen de la localización de los dobles enlaces ($\Delta^1-\Delta^1$), pero no de la longitud de la cadena ($C_{16}-C_{22}$) y el grado de insaturación de la misma (1-6 dobles enlaces) (Yang y col., 1990).

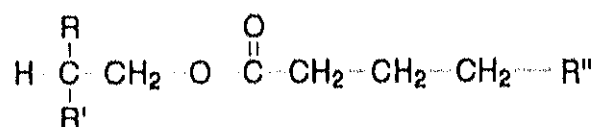
2) Presencia de cadenas ramificadas y/o grupos funcionales.

La intensidad de la hidrólisis de triglicéridos que contienen ácidos grasos con cadena ramificada, depende principalmente de la posición de los grupos alquilo dentro de la cadena pero no de su número (Tagiri y col., 1992).

La hidrólisis de triglicéridos que poseen ácidos grasos con grupos funcionales depende de las propiedades de estos últimos siempre que estén localizados en la misma posición de la cadena del ácido graso. De esta forma, los grupos hidrofílicos (hidroxilo) inhiben la lipólisis, mientras que los grupos hidrofóbicos (alquilo, O-metilo y O-acetilo), la favorecen. Este efecto se produce siempre que los sustituyentes estén situados lejos del grupo carboxílico del ácido graso (Tagiri y col., 1992).

La siguiente estructura (figura 33) muestra los requerimientos mínimos para los sustratos de lipasa (Sémériva y Desnuelle, 1979).

Figura 33.- Estructura molecular básica de los sustratos de lipasa pancreática.



El estado físico de los triglicéridos también afecta la hidrólisis en medio acuoso ya que los triglicéridos en estado sólido difícilmente se dispersan en agua en comparación con los triglicéridos en estado líquido. De esta forma, se ha relacionado la poca actividad de lipasa sobre triglicéridos constituidos por ácidos grasos saturados tales como C18:0 y C16:0, con la baja dispersión de estos sustratos basada en su alto punto de fusión (Brockerhoff y Jensen, 1974).

I.3.8 MODULADORES DE LA LIPOLISIS.

Se han descrito muchas sustancias como moduladores de la actividad enzimática de las lipasas, algunas son las siguientes:

- Cationes.

La presencia de Na^+ en el medio de reacción incrementa la actividad de lipasa por un doble efecto ya que: favorece la formación de sales sódicas de ácidos grasos, que son hidrofílicas y van hacia la fase acuosa, permitiendo de esta forma que nuevas moléculas de triglicéridos interaccionen con la enzima en la interfase. Además, la presencia de Na^+ estabiliza las gotículas de la emulsión favoreciendo los fenómenos interfaciales (Hernández y col., 1994a).

La presencia de iones Ca^{2+} se ha comprobado que incrementan la actividad lipolítica de lipasa pancreática (Benzonana, 1968; Junge, 1984; Scow, 1988) debido a la formación de sales con ácidos grasos liberados en la interfase que son inhibidores de la enzima.

Este efecto también se ha observado con Mg^{2+} y Ba^{2+} en el caso de la lipasa de *Candida cylindracea* (Hernández y col., 1994a) y con Ca^{2+} y Mg^{2+} para la lipasa de *Pythium ultimum* (Mozaffar y Weete, 1993).

No obstante en las lipasas de *Staphylococcus hyicus* (Van Oort y col., 1989) y *Pseudomonas fragi* (Tsuzuki y Suzuki, 1991) los iones Ca^{2+} parecen tener más un papel estructural que estar implicados en la catálisis por eliminación del producto de reacción. El Fe^{3+} y Hg^{2+} inhiben la lipólisis catalizada por la lipasa de *Penicillium camembertii* (Yamanane y Mase, 1991) y *Pseudomonas* (Sugiura y col., 1977). La actividad de la lipasa

de *Pythium ultimum* se ve reducida en presencia de Fe^{2+} , Co^{2+} , Sn^{2+} y Mn^{2+} (Mozaffar y Weete, 1993).

También existen lipasas a las cuales la presencia de iones divalentes no afecta a la actividad de la enzima. Este es el caso de las lipasas de *Geotrichum candidum* y *Rhizopus arrhizus* (Veeraragavan, 1990).

- Sales biliares y colipasa.

Fisiológicamente, los triglicéridos son emulsionados gracias a la presencia de sales biliares y fosfolípidos en el medio intestinal (Verger, 1984).

Existe numerosa bibliografía acerca del efecto de las sales biliares sobre la actividad de la lipasa pancreática. Dependiendo del sistema de ensayo usado y de su concentración final en la mezcla de reacción, estos tensioactivos pueden tener un efecto activador o bien inhibidor de la enzima (Benzonana, 1969; Benzonana y Desnuelle, 1968; Chapus y col., 1988; Queralto Moreno y col., 1984; Scow, 1988). Sin embargo, la mayoría de los estudios llevados a cabo antes del descubrimiento de la colipasa en 1972 son difíciles de comentar ya que el contenido de colipasa en las preparaciones de lipasa es desconocido. Actualmente se sabe que el papel de las sales biliares en la actividad de lipasa pancreática depende de su concentración en el medio (Junge, 1984).

Las sales biliares a bajas concentraciones favorecen la lipólisis ya que incrementan la estabilidad de la enzima (Momsen y Brockman, 1976a y 1976b) y retiran los ácidos grasos de la interfase, permitiendo que la hidrólisis se mantenga a niveles constantes (Benzonana, 1969).

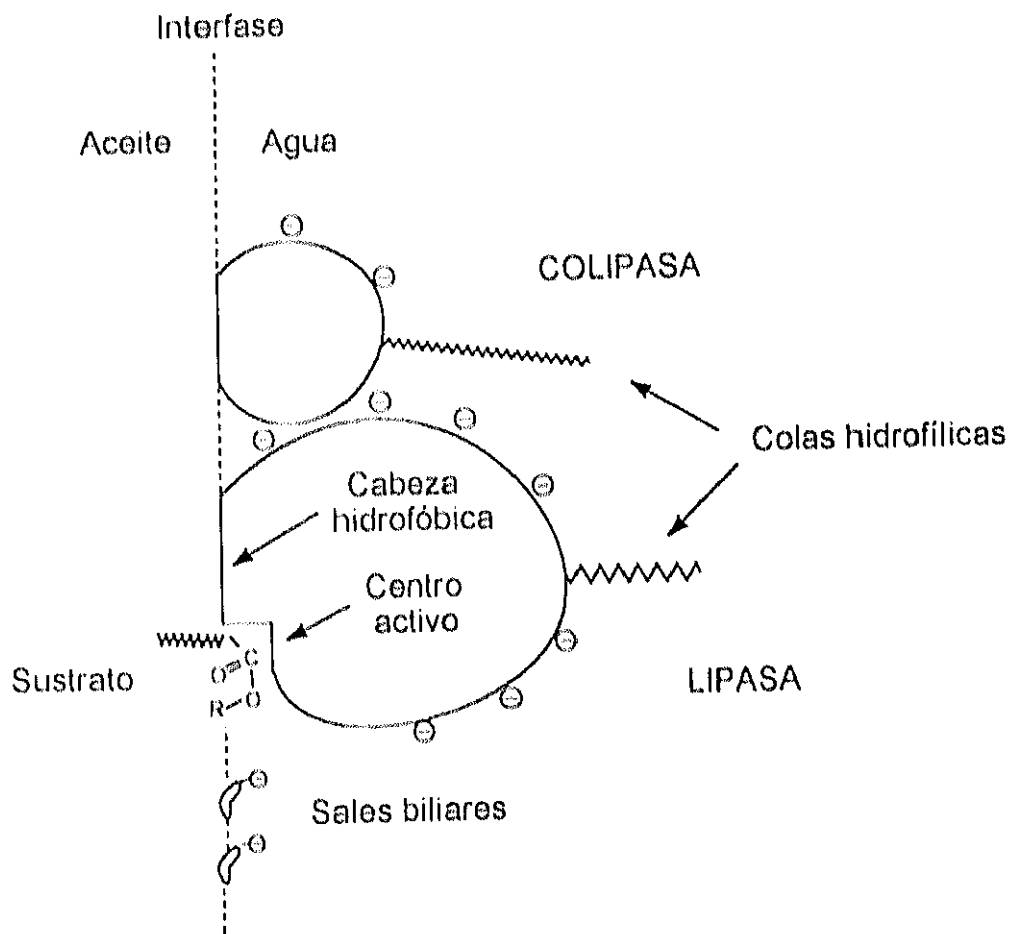
Sin embargo, en condiciones fisiológicas, los ácidos biliares, inhiben la lipólisis (Constantin y col., 1960). Esta inhibición se debe a que las sales biliares, y en general los compuestos anfifílicos, se acumulan en la interfase impidiendo el acercamiento de la lipasa (Chapus y col., 1988; Queralto Moreno y col., 1984). Por otro lado, a concentraciones superiores a la micelar crítica, que es la concentración a partir de la cual los ácidos biliares se organizan en micelas, dichas micelas compiten en la interfase por la posesión de la enzima (Sémériva y Desnuelle, 1979).

El efecto producido por las sales biliares depende del número de grupos hidroxilo presentes en su molécula y de si éstos se encuentran conjugados o no con aminoácidos tales como taurina o glicina (Arzoglou, 1994; Benzonana y Desnuelle, 1968).

El efecto inhibitor de las sales biliares, se ve contrarrestado por la acción de un cofactor proteico, no enzimático, de la lipasa pancreática, la colipasa (Maylié y col., 1971).

La colipasa presenta dos zonas específicas, una es la zona de reconocimiento de interfase y otra es el lugar de unión a la lipasa (Chapus y col., 1988). Según estos mismos autores, en presencia de interfases recubiertas de moléculas de sales biliares, la colipasa se adsorbe primero, lo que sirve como anclaje para que la lipasa se adsorba después, ya que la colipasa presenta mayor afinidad que lipasa sobre este tipo de interfases. Este anclaje implica además que, tras la adsorción, se produzca un cambio conformacional en el cofactor, que cree un lugar que sea reconocido específicamente por la lipasa. En la figura 34 aparece la actuación del complejo lipasa-colipasa en interfases recubiertas de sales biliares.

Figura 34.- Actuación del sistema lipasa-colipasa en interfases recubiertas de sales biliares.



- Inactivación interfacial.

Las proteínas en general se inactivan en presencia de interfases separándose la parte polar de la apolar. La lipasa pancreática se desnaturaliza cuando se adsorbe a la interfase de sustratos como la tributirina o aceite de oliva y agua (Brockerhoff, 1971).

Alsina y col. (1989) observaron que la presencia de trioleína retarda la desnaturalización de la enzima sobre la superficie. Los estudios cinéticos muestran que taurocolato y albúmina previenen pero no revierten la desnaturalización de la enzima mediante un mecanismo inespecífico (Brockerhoff, 1971). Por el contrario, la colipasa puede interaccionar específicamente con la lipasa en la interfase formando complejos estequiométricos 1:1 que son más resistentes a la desnaturalización interfacial (Sémériva y Desnuelle, 1979).

- Proteínas.

Las proteínas presentan un efecto similar al de los ácidos biliares sobre la actividad de lipasa. Se ha visto que la albúmina sérica a bajas concentraciones protege a la molécula de lipasa del desdoblamiento interfacial (Brockerhoff, 1971).

Por el contrario, a altas concentraciones impide la adsorción de la enzima a la interfase ya que es la albúmina la que se adsorbe impidiendo el acercamiento de la lipasa (Borgström y Erlanson, 1978). La presencia de sales biliares en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, impide la unión de cualquier proteína, incluida la lipasa, a la interfase de los triglicéridos y como consecuencia la reacción lipolítica no tiene lugar. Una función importante de las sales biliares en el intestino es mantener la interfase libre de proteínas que pueden impedir la unión de la lipasa a la misma. La presencia de la colipasa a nivel intestinal permite que se restablezca la actividad catalítica de la lipasa pancreática, ya que actúa como anclaje de ésta contrarrestando el efecto inhibitorio de las sales biliares (Borgström y Erlanson, 1978).

- Ácidos grasos, n-alcoholes de cadena larga, hidrocarburos y derivados halogenados.

Los ácidos y los alcoholes inhiben la lipólisis por un efecto combinado; por una parte inhiben la lipólisis propiamente dicha ya que compiten con los triglicéridos por el centro

activo (Tanaka y col., 1981) y por otra inhiben la activación interfacial por dilución del sustrato disponible para la enzima en la interfase (Borgström y Erlanson, 1973).

Los hidrocarburos y derivados halogenados también inhiben la lipólisis al cubrir la superficie del sustrato o de la enzima impidiendo la formación del complejo enzima-sustrato (Sugiura, 1984).

1.3.9 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPASICA.

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3), como ya se ha dicho anteriormente, son enzimas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para dar lugar a ácidos grasos y glicerol. La actividad lipolítica de dichas enzimas se pone de manifiesto generalmente por una acumulación de ácidos grasos libres y una desaparición de triglicéridos en el medio de reacción.

Unidades de actividad:

La IUPAC-IUB define la unidad de actividad lipolítica (U) como la cantidad de enzima que, actuando sobre un éster emulsionado y en las condiciones de ensayo, libera un μ equivalente de ácido por minuto. La actividad específica se define como los μ moles de ácidos grasos liberados por minuto y por mg de proteína.

La determinación de la actividad enzimática debe realizarse en condiciones óptimas y por ello el estudio de parámetros como temperatura, pH, presencia de cationes y de aceptores de ácidos grasos proporcionan la información necesaria para el diseño de un sistema de ensayo apropiado (Jensen, 1983).

1.3.9.1 Sustratos.

La elección del sustrato más idóneo para cada caso es fundamental.

Trioleína: es un sustrato ideal para lipasas ya que se encuentra en estado líquido en las temperaturas usuales de ensayo y es fácil de emulsionar.

Aceite de oliva: es un buen sustituto de trioleína y además es mucho más barato.

Tributirina: presenta la ventaja de que se puede dispersar en agua mediante agitación sin necesidad de agentes emulsificantes. A pesar de ser hidrolizado por la mayoría de las lipasas, algunas esterases también lo pueden hidrolizar lo que obliga a que la actividad lipásica deba ser verificada con trioleína.

En muchas ocasiones se usan **sustratos cromogénicos** como ácidos grasos esterificados con fenol, umbeliferona, naftol, eosina, etc. La liberación de los ácidos grasos de los cromóforos se determina directamente por fluorimetría (Dooijewaard-Kloosterziel y Wunters, 1976; Roy, 1980).

En otras ocasiones se usan acilgliceroles esterificados con ácidos grasos que pueden dar lugar a una prueba coloreada. Los ácidos grasos pueden medirse por espectrofotometría directamente o después de ser tratados con un reactivo formador de color (van Aufrève y col., 1991).

1.3.9.2 Condiciones.

El pH óptimo para la mayoría de las lipasas se encuentra entre 7 y 9. Los tampones tradicionalmente usados son fosfato, $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ y Tris.

Las lipasas en general son activas en un amplio rango de temperatura que va desde -20°C hasta 65°C pero generalmente actúan entre 30 y 45°C . Este criterio válido en medio acuoso se puede ampliar cuando se trabaja en medios orgánicos y con bajo contenido en agua. Así la lipasa pancreática porcina cataliza la reacción de transesterificación entre tributirina y varios alcoholes primarios y secundarios a 100°C (Zaks y Klivanov, 1984).

El sustrato debe estar emulsionado y cuanto menor sea el tamaño de las gotículas de la emulsión, mayor superficie presentará el sustrato a la enzima y mayor será la velocidad de hidrólisis.

Las emulsiones son sistemas altamente energéticos, y por tanto inestables, que tienden a evolucionar espontáneamente hacia su propia destrucción (Barbe Rocabert y col., 1990a). El empleo de emulsificantes, estabilizantes o ambos, es necesario para preparar emulsiones relativamente estables. Se ha estudiado el efecto de diferentes tensioactivos sobre la hidrólisis catalizada por lipasas (Hendrick y col., 1992; Koseki y col., 1989; Mozaffar y col., 1994; Skagerlind y Jansson, 1992). Algunos emulgentes comúnmente usados son dodecil sulfato sódico, sales bilares, detergentes no iónicos etc.

El uso de estabilizantes como goma arábiga puede mantener emulsiones sin la adición de agentes activos de superficie. Veeraragavan (1990), utilizó diferentes solubilizantes para emulsionar trioleína usada como sustrato de lipasas microbianas, llegando a la conclusión de que la goma arábiga es el más apropiado para la preparación de sustratos emulsionados. Sin embargo, otros autores (Tietz y col., 1989) prefieren el uso de hidroxipropil metilcelulosa como agente emulgente. La mezcla debe contener suficientes iones Na^+ y H^+ para suprimir la inhibición enzimática por efecto de carga a nivel interfacial. Los iones calcio, magnesio o la albúmina bovina actúan como aceptores de ácidos grasos retirándolos de la interfase y evitando que inhiban la lipólisis.

Para detener la hidrólisis enzimática, generalmente se suele adicionar ácido al medio de reacción. El ácido por un lado inactiva la lipasa, convierte los jabones en ácidos grasos libres y previene la emulsificación de la muestra durante la extracción subsiguiente. La mezcla hidrolizada puede ser entonces extraída con disolventes orgánicos (Bornemann y col., 1992) o por el contrario, analizada directamente por medio de la adición de disolventes y posterior titración (Moskowitz y col., 1977).

En la mayoría de los métodos que se han descrito, los ácidos grasos libres no son aislados de la mezcla de digestión. Si es necesario, esto se puede realizar mediante extracción selectiva (Khoo y Steinberg, 1981), reteniéndolos con resinas de intercambio iónico (Edwards-Webb, 1975), separándolos mediante columnas de silicagel (Woo y Lindsay, 1980), por cromatografía en capa fina (Bottino y col., 1967) o por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Veeraragavan, 1990). Dutta y col. (1978), hidrolizaron triglicéridos con lipasa pancreática directamente sobre una placa de cromatografía, después separaron los productos de digestión, y los ácidos grasos libres los cuantificaron mediante cromatografía gaseosa.

I.3.10 METODOS DE DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPASICA.

I.3.10.1 Métodos titrimétricos.

Estos métodos se basan en la valoración volumétrica de los ácidos grasos liberados como consecuencia de la hidrólisis enzimática de los sustratos. Dicha valoración se lleva a cabo directamente sobre la mezcla de ensayo.

La valoración de los ácidos grasos liberados como consecuencia de la hidrólisis enzimática puede realizarse en continuo, o una vez que la reacción enzimática ha sido parada con diferentes disolventes como acetona-etanol (1:1) (Kanasawud y Phutrakul, 1993; Mustranta, 1992) o etanol (Skagerlind y Jansson, 1992).

Mediante la valoración continua se determina la actividad lipásica en función del gasto de solución valorante necesario para mantener el pH en un valor constante a lo largo del ensayo (Brockerhoff, 1970; Hernáiz y col., 1994b; Junge, 1984; Marchis-Mouren y col., 1959), lo que permite conocer el comportamiento cinético de la enzima.

En una revisión realizada por Arzoglou (1994), se afirma que el método titrimétrico es el de elección para determinar la actividad de lipasa pancreática. Según este autor el método presenta numerosas ventajas tales como la posibilidad de emplear altas concentraciones de sustrato permitiendo así la determinación directa de los productos de lipólisis sin fenómenos de interferencia. Además, proporciona los resultados en unidades internacionales (Tietz y Repique, 1973).

I.3.10.2 Métodos turbidimétricos.

Se basan en el descenso de la turbidez de una emulsión, por la desaparición de sustratos insolubles y el aumento de la cantidad de ácidos grasos libres disueltos en el tampón, como consecuencia de la actividad de lipasa (Neumann y col., 1984).

I.3.10.3 Métodos espectrofotométricos.

Inclusión de un cromóforo: se utilizan sustratos que al hidrolizarse liberan productos que pueden ser cuantificados mediante técnicas espectrofotométricas (Gatt y col., 1981; Mosmuller y col., 1992).

Conversión a sales de cobre: los ácidos grasos son convertidos en jabones de cobre, los cuales pueden ser medidos espectrofotométricamente después de su reacción con compuestos cromogénicos.

I.3.10.4 Cromatografía gaseosa.

Esta técnica permite la cuantificación de los ácidos grasos liberados durante la lipólisis a partir de su derivatización a ésteres metílicos y con la utilización de estándares internos tales como ácido pentadecaenoico (C15:0) o ácido heptadecanoico (C17:0) (Chapman, 1979).

I.3.10.5 Otros métodos.

Mediante otros métodos, los ácidos grasos liberados:

- Se tratan con otras enzimas y dan lugar a productos que son detectados a muy bajas concentraciones (Minzano y col., 1980).

- Provocan el desplazamiento de un complejo ácido graso-proteína el cual es muy fluorescente. La actividad lipásica se pone de manifiesto por la disminución de la fluorescencia del medio de reacción (Wilton, 1990).

En otras ocasiones se utilizan ácidos grasos marcados radioactivamente (Jensen y col., 1982) o se detecta la actividad lipásica mediante técnicas inmunológicas (Grenner y col., 1982).

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Teniendo en cuenta lo expuesto en la Introducción, abordaremos los siguientes objetivos:

1.- Estudio de la alteración producida en diferentes aceites vegetales como consecuencia del proceso de fritura. El cual se plantea considerando por un lado la discrepancia de criterios sobre la conveniencia de renovar o no frecuentemente el aceite del baño de fritura mediante la adición de aceite sin usar, y, por otro, dada la utilización creciente de nuevas grasas culinarias en la industria alimentaria para la fritura de alimentos. Este primer objetivo constará de los siguientes puntos:

1.1.- Puesta a punto y control de calidad de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño molecular (HPSEC), a emplear en la cuantificación de productos característicos de la alteración de aceites por fritura.

1.2.- Estudio de la influencia de la modalidad de fritura empleada, con o sin renovación de aceite, sobre el grado de alteración producida en el aceite de girasol después de frituras repetidas y discontinuas de patatas. Estudio de su rendimiento y vida útil.

1.3.- Estudio y caracterización de la alteración producida en una oleína de palma después de su utilización en frituras repetidas y discontinuas de patatas sin renovación de aceite. Comparación con la producida en el aceite de girasol en las mismas condiciones experimentales.

2.- Estudio de la acción hidrolítica de la lipasa pancreática porcina *in vitro* sobre aceites con diferente grado de alteración. Este objetivo se plantea dado el interés creciente en la bibliografía por dilucidar ciertos aspectos relacionados con la digestión de grasas termooxidadas. Este segundo objetivo contempla los siguientes aspectos:

2.1.- Obtención y caracterización de las diferentes sustancias utilizadas como sustratos modelo, en la hidrólisis por lipasa pancreática.

2.2.- Caracterización y cuantificación mediante HPSEC de los diferentes sustratos después de su hidrólisis con lipasa pancreática realizada según adaptación de la Norma UNE.

Objetivos y Plan de Trabajo

2.3.- Puesta a punto de un método para valorar a pH fijo (pH-stato) la actividad enzimática de lipasa pancreática porcina frente a sustratos con diferente grado de alteración procedentes de frituras o calentamiento en reactor abierto.

2.4.- Seguimiento cinético de la hidrólisis enzimática de diferentes sustratos procedentes de frituras o calentamiento en reactor abierto, a fin de determinar las constantes cinéticas y establecer un modelo de comportamiento de dichos sustratos frente a la lipasa pancreática porcina.

Pensamos que la consecución de estos objetivos justifican la realización y presentación de esta Memoria de Tesis Doctoral.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 FRITURA DE PATATAS EN ACEITE DE GIRASOL. ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA EN DICHO ACEITE UTILIZANDO DOS MODALIDADES DIFERENTES DE FRITURA.

III.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL. CONDICIONES DE FRITURA.

Para la realización de las diferentes frituras repetidas se utilizó como grasa culinaria aceite de girasol refinado (Koipesol; Andujar, Jaen) de una acidez máxima de 0.2°.

Como alimento a freír se escogieron patatas nuevas (variedad Kennebec). Las frituras se realizaron en freidoras domésticas de 3 litros de capacidad. En cada una de las freidoras se puso una cantidad de 500 g de patatas peladas, limpias y secas, cortadas en rodajas finas de aproximadamente 2 mm de espesor. La relación grasa culinaria/alimento fue por tanto de 3 l/500 g.

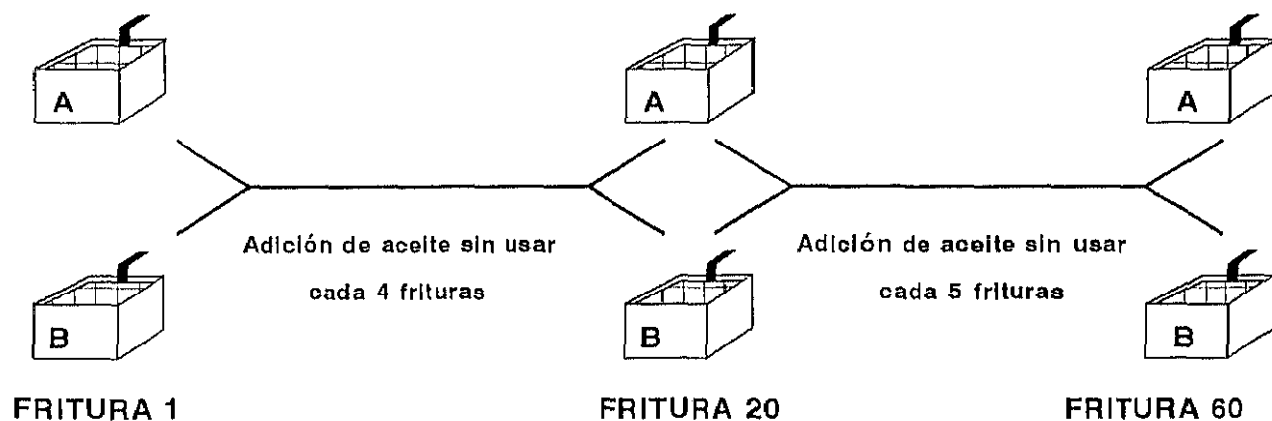
III.1.1.1 Fritura con recambio frecuente de aceite.

Esta modalidad de fritura consiste en la adición, cada cierto tiempo, de una determinada cantidad de aceite sin usar a la freidora para así mantener constante el nivel de aceite del baño de fritura y por tanto la relación grasa culinaria/alimento a freír.

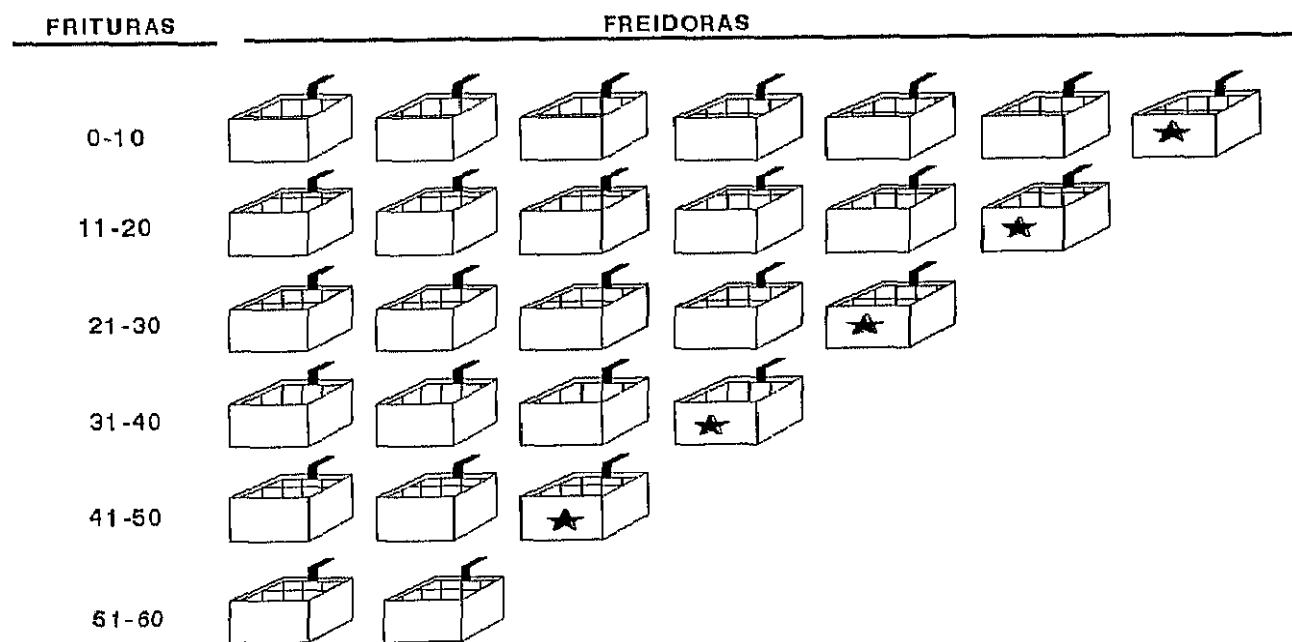
Para llevar a cabo dicho estudio, se realizaron setenta y cinco frituras de patatas en dos freidoras en las que, para mantener constante el volumen del aceite del baño (3 l) y la proporción grasa culinaria/alimento a freír (3 l/500 g), se añadió aceite sin usar cada 4-5 frituras. El aceite de girasol sin usar se añadió cada 4 frituras hasta la fritura veinte. Después de la fritura veinte el volumen de cada freidora se completó cada 5 frituras, para conseguir 10 frituras por día, ya que la adición de aceite nuevo cada 5 frituras en lugar de cada 4, no cambiaba los objetivos de la experiencia y sin embargo aceleraba el estudio (figura 35).

El alimento se introdujo en el aceite cuando éste último alcanzó una temperatura estable de 180° C, para lo cual se necesitaron unos veinte minutos. La duración de cada

**Figura 35.- Esquema de frituras en aceite de girasol con
recambio frecuente de aceite.**



**Figura 36.- Esquema de frituras en aceite de girasol sin
recambio frecuente de aceite.**



Freidora eliminada. Su contenido pasa a completar el volumen de las otras freidoras.

fritura fue, en todos los casos, de ocho minutos. Entre una fritura y otra el aceite se calentó de nuevo hasta 180° C durante diez minutos.

La temperatura de las freidoras se controló en el 1º, 2º, 5º, 6º y 8º minuto de fritura, mediante termómetros graduados con una escala de 0 a 200° C.

Como ya se ha mencionado, hasta la fritura veinte, se realizaron ocho frituras diarias en dos series diferentes de cuatro frituras cada una, entre las cuales se dejó enfriar el aceite durante cinco horas. Al final de cada día el aceite permaneció a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Desde la fritura vigésimo primera y hasta el final del experimento (setenta y cinco frituras), se realizaron diez frituras diarias en dos series de cinco frituras cada una (figura 35).

Por consiguiente, las setenta y cinco frituras repetidas se realizaron siguiendo un proceso discontinuo con adición frecuente de aceite de girasol sin usar. El tiempo total de calentamiento del aceite fue aproximadamente de 25 horas y 20 minutos. Cada cinco frituras la cantidad de aceite disminuyó aproximadamente en un 9%, lo que implica que la cantidad total de aceite nuevo añadido fue de 4,5 litros aproximadamente.

Al finalizar las frituras 4ª, 8ª, 12ª, 16ª, 20ª, 25ª, 30ª, 35ª, 40ª, 45ª, 50ª, 55ª, 60ª, 70ª, y 75ª, se midió el volumen del aceite del baño, a fin de conocer el rendimiento ponderal de dicho aceite, durante las frituras repetidas.

III.1.1.2 Fritura sin recambio de aceite.

En esta modalidad de fritura, para mantener constante el volumen del aceite del baño y la proporción grasa culinaria alimento a freír en 3 1/500 g, se partió de un número elevado de freidoras y, cada diez frituras, una freidora fue eliminada y con su aceite se completó el volumen de las demás a 3 litros.

De esta forma se realizaron un total de sesenta frituras de patatas, a razón de diez frituras por día, partiendo de siete freidoras diferentes (figura 36).

De la misma forma que en el estudio anterior, el alimento se añadió cuando el aceite alcanzó una temperatura estable de 180° C y la duración de cada fritura fue de ocho minutos. La temperatura de las freidoras se controló durante los minutos 1º, 2º, 5º, 6º y 8º de la fritura mediante termómetros graduados de 0 a 200°C.

Para llevar a cabo dicho estudio, se realizaron diez frituras de patatas diarias divididas en dos series de cinco frituras cada una y separadas por un periodo de enfriamiento del aceite de cinco horas. Después de cada día, el aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente, en la que permaneció hasta el día siguiente. En esta modalidad de fritura, el tiempo total de calentamiento del aceite puede situarse en aproximadamente 20 horas.

En ambos casos, paralelamente al proceso de fritura, se llevó a cabo la pesada de las patatas una vez fritas.

En la tabla aparece un resumen de las condiciones del proceso empleadas en ambos estudios.

Tabla 1. Condiciones del proceso en ambas modalidades de fritura.

Variables	Recambio frecuente de aceite	Sin recambio de aceite
Grasa culinaria	Aceite refinado de girasol	Aceite refinado de girasol
Número de freidoras	Dos	Siete
Material del recipiente	Aluminio	Aluminio
Capacidad del recipiente	3 l	3 l
Cantidad de patatas por fritura	500 g	500 g
Tipo de calentamiento	Discontinuo	Discontinuo
Temperatura inicial del aceite	180°C	180°C
Tiempo de fritura	75 periodos de 8 minutos durante 8 días	60 periodos de 8 minutos durante 6 días
Tiempo total de fritura	≈ 25 h y 30 min	≈ 20 h
Muestras de aceite seleccionadas procedentes de la fritura nº	0, 20, 30, 50 y 75	0, 10, 30, 50 y 60

III.1.2 RECOGIDA Y PREPARACION DE LOS ACEITES.

En el primer experimento (fritura con recambio frecuente de aceite), se tomaron alícuotas del aceite crudo y después de las frituras 20, 30, 50 y 75.

Durante la realización de las frituras sin recambio de aceite, se recogieron alícuotas de aceite sin usar y del procedente de las frituras 10, 30, 50 y 60.

Las muestras una vez frías se guardaron bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su posterior análisis.

III.1.3 ANALISIS DE LOS ACEITES. MEDIDA DE LA ALTERACION.

Se llevó a cabo el análisis del aceite de girasol de partida, así como del procedente de diferentes frituras de patatas tanto con recambio frecuente de aceite fresco como sin él.

Para ello, se utilizaron diversas técnicas a fin de valorar los cambios sufridos por los aceites así como para caracterizar la alteración termooxidativa e hidrolítica originada en los mismos como consecuencia del proceso de fritura.

Algunos de los índices analíticos utilizados tales como los físicoquímicos de carácter general, son clásicos en el estudio de las grasas y están normalizados; sin embargo, es preciso referir estos índices a los valores de los mismos en la grasa original.

Los métodos utilizados han sido clasificados en:

- 1.- Índices físico-químicos de carácter general.
- 2.- Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.
- 3.- Métodos analíticos que cuantifican los compuestos específicos de la alteración.

III.1.3.1 Índices físico-químicos de carácter general.

III.1.3.1.1 INDICE DE REFRACCION.

Se determinó siguiendo la Norma UNE 55-015 (1958). El índice de refracción de una sustancia para una longitud de onda determinada, es la relación entre los senos de los ángulos

de incidencia y de refracción que un rayo de luz, de esta longitud de onda, determina al hacerlo pasar del aire a la sustancia.

El índice de refracción se determinó a 20°C en relación a la línea D del sodio ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$).

El material necesario para las determinaciones consistió en un refractómetro de prismas (refractómetro de Abbe). El refractómetro utilizado estaba provisto de un sistema de compensación, puesto que se trabajó con luz blanca. La lectura exacta se realizó hasta la tercera cifra decimal.

III.1.3.1.2 DETERMINACION DE LA ACIDEZ LIBRE.

Se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en la Norma UNE 55-011 (1964). Se denomina grado de acidez, al porcentaje de ácidos grasos libres que contiene un aceite o una grasa.

Para llevar a cabo dicha determinación se pesaron 10 g de aceite a los que se añadió una mezcla formada por 25 ml de alcohol etílico, 25 ml de eter etílico y 5 ml de fenolftaleína al 1% en etanol. Dicha mezcla fue previamente neutralizada con KOH 0,1 N. La solución de KOH 0,1 N, a su vez, había sido valorada con anterioridad utilizando como patrón el ácido benzoico. Con dicha disolución de KOH 0,1 N se llevó a cabo la valoración de los ácidos grasos libres del aceite.

El grado de acidez expresado en relación al ácido oleico, viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Acido oleico (\%)} = \frac{28,2 * V * N}{G}$$

siendo:

G= Peso de la materia grasa, en gramos.

V= Volumen consumido de la disolución de hidróxido potásico, expresado en mililitros.

N= Normalidad de la disolución alcalina utilizada.

La acidez puede expresarse, además, como índice de acidez que se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56,11 * V * N}{G}$$

donde:

G, V y N representan lo mismo que en el caso anterior.

III.1.3.2 Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.

III.1.3.2.1 DETERMINACION DE LA COMPOSICION PORCENTUAL EN ACIDOS GRASOS.

III.1.3.2.1.1 Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

El fundamento de esta técnica es la saponificación de los glicéridos, y la liberación y esterificación de los ácidos grasos mediante metanol en presencia de trifluoruro de boro (IUPAC, 1987a).

*** Reactivos:**

Cloroformo, metanol y hexano (Carlo Erba); NaOH, NaCl y benceno (Panreac); Trifluoruro de boro al 20% en metanol (Merck).

*** Procedimiento operativo:**

Se pesaron 100 mg de aceite y se disolvieron en 10 ml de cloroformo. Se cogieron 100 μ l de esta disolución y se introdujeron en un tubo pirex de 10 ml de capacidad con tapón de rosca provisto de una pieza de teflón en su interior para permitir la condensación del disolvente.

El disolvente de la muestra se evaporó introduciendo el tubo en un baño de agua a 35°C y bajo corriente de nitrógeno.

A la muestra de aceite se le añadieron 500 μ l de una solución de NaOH 0.5 N en metanol calentándose a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de benceno y 400 μ l de una solución al 20% de trifluoruro de boro en metanol y se calentó la muestra a 90°C durante 60 minutos. A continuación se dejó enfriar el tubo a temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de solución sobresaturada de NaCl.

La extracción de los ésteres metílicos se realizó con 2 ml de hexano repitiendo la operación tres veces. El disolvente se evaporó en baño de agua a 35°C bajo corriente de nitrógeno y posteriormente la muestra se redisolvió en 300 μ l de hexano para su posterior análisis mediante cromatografía gaseosa.

III.1.3.2.1.2 Análisis de los ésteres metílicos mediante cromatografía gaseosa.

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en la distinta velocidad de migración de cada uno de los componentes de una muestra compleja, en estado gaseoso, a lo largo de un medio estacionario formado por una columna cromatográfica por la que pasa un gas portador inerte (en nuestro caso, nitrógeno). Mediante un detector de ionización de llama, dispuesto al final de la columna, se evalúa la cantidad de moléculas de los distintos componentes frente al tiempo y se obtiene un cromatograma.

El cromatógrafo utilizado realiza una cromatografía gas-líquido, en la que la fase estacionaria es una disolución retenida en el seno de la columna, y su funcionamiento se basa en fenómenos de partición o reparto.

*** Procedimiento operativo.**

Para el análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II (Palo Alto, CA), con detector de ionización de llama. La columna utilizada era de acero inoxidable de 2 m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro interno, siendo su fase estacionaria Supelcoport 2330 al 10% sobre Chromosorb WAW 100/120 (Supelco, Barcelona).

El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 30 ml/min y el de hidrógeno de 30 ml/min. El flujo de aire fue de 240 ml/min.

La temperatura de trabajo de la columna se programó manteniéndose isotérmicamente a 170°C durante 8 minutos. A continuación, se incrementó hasta 240°C a razón de 4°C/min manteniéndose a dicha temperatura durante 5 minutos.

Los volúmenes de muestra inyectados fueron de 1 µl. Las áreas de los picos se calcularon con la ayuda de un integrador Hewlett-Packard 3396 Series II.

La identificación de los picos se realizó atendiendo al tiempo de retención relativo y absoluto de patrones conocidos (Sigma Co; Alcobendas, Madrid).

III.1.3.2.2 DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS TRIGLICERIDOS NO POLARES Y DE COMPUESTOS POLARES DEL ACEITE.

Esta determinación se realizó utilizando una ligera modificación de las técnicas de separación cromatográfica propuestas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) en 1987 (Walting y Wessels, 1981) para el análisis de las grasas de fritura a partir del método original de Guhr y Waibel (1978).

Posteriormente dicha técnica fue adoptada por la legislación española (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989) como método oficial para determinar la alteración de aceites termooxidados.

El fundamento de este método se basa en la separación global, mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, de los triglicéridos que permanecen inalterados de aquellos compuestos que han sufrido alteración al menos en uno de sus restos acilo. Posteriormente, ambas fracciones se cuantificaron gravimétricamente (Pérez-Camino, 1986; Arroyo y col., 1992)

* Material y reactivos:

- Columna de vidrio de 45 cm de altura, 1,6 cm de diámetro interno y llave de teflón.
- Silicagel 60 (63-200 µm) (Merck). Desecado en estufa a 160°C durante al menos cuatro horas. En el momento de su uso se añadió agua destilada para ajustar su contenido de agua al 5%. Finalmente se agitó vigorosamente el recipiente hasta que la sílice no quedó adherida a las paredes (durante unos 10 minutos).
- Hexano, eter etílico (Carlo Erba) y arena de mar, reactivo para análisis (Merck).

- Placas de silicagel F₂₅₄ para cromatografía en capa fina de 0.2 mm de espesor (Merck).

*** Preparación de la columna:**

Se pesaron 20 g de silicagel hidratado con un contenido en agua del 5% y se añadieron 45 ml de una mezcla de hexano/éter etílico 87:13 en el caso de aceites sin usar y 90:10 cuando se trataba de muestras procedentes de diferentes frituras de patatas. La mezcla se transfirió a la columna en cuyo fondo previamente se había colocado una bola de algodón humedecido en la mezcla eluyente, eliminándose el disolvente en exceso sin que en ningún momento dejara de cubrir la sílice y agregándose finalmente 2 g de arena de mar. La altura de la columna de sílice era de 30 cm.

*** Procedimiento operativo.**

Se pesó 1 g de aceite, con la exactitud del mg y se le añadieron 5 ml de la mezcla hexano/éter etílico. El contenido se recogió con una pipeta Pasteur y se transfirió a la columna, lavando varias veces para asegurarse que el total del aceite se encontraba en la columna.

Una vez la muestra en la columna, se eluyeron los triglicéridos no polares con 150 ml de la mezcla de hexano/éter etílico 87:13 para aceites sin usar, o 90:10 si se trataba de muestras procedentes de frituras de patatas. A continuación, los compuestos polares se eluyeron con 150 ml de éter etílico. Después de cada elución, se lavó cuidadosamente la salida de la columna para eliminar algún posible resto de la muestra. El flujo se ajustó de tal forma que los 150 ml eluyeron por la columna en unos 30 minutos.

Las dos fracciones eluidas se recogieron en matraces previamente tarados. El disolvente, en ambos casos, se eliminó utilizando un rotavapor con baño de agua a 35°C, bajo corriente de nitrógeno. Una vez evaporado el disolvente, cada una de las fracciones se cuantificaron por gravimetría.

*** Valoración de la eficacia de la separación cromatográfica.**

La eficacia de la separación se comprobó mediante cromatografía en capa fina. Las dos fracciones obtenidas se diluyeron 50 veces en hexano/éter etílico 80:20. Las muestras

se aplicaron en la placa cromatográfica con la ayuda de una microjeringa Hamilton 705. Se utilizó como líquido de desarrollo una mezcla de hexano/eter etílico/ácido acético (80:20:1).

La visualización de las manchas se obtuvo con vapores de yodo.

III.1.3.3 Métodos analíticos que cuantifican los compuestos específicos de la alteración.

III.1.3.3.1 DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE LA ALTERACION TERMOOXIDATIVA E HIDROLITICA.

Para esta determinación se utilizó una combinación de las técnicas de cromatografía de adsorción en columna y de cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño molecular (HPSEC).

La cromatografía de adsorción en columna, descrita en el apartado III.1.3.2.2, se utiliza con objeto de concentrar la muestra en componentes polares (Dobarganes y col., 1988). La cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión (HPSEC), permite separar los distintos componentes de la fracción alterada de los aceites, obteniendo de esta forma una mayor información acerca de las alteraciones hidrolíticas y/o termooxidativas que se producen en éstos durante la fritura de los alimentos. La separación de los diferentes componentes se produce en función de su peso molecular (Christie, 1987).

*** Procedimiento operativo.**

La fracción polar de los diferentes aceites, obtenida previamente mediante cromatografía en columna, se analizó mediante HPSEC.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Konik 500A (Barcelona) con un *loop* de 10 μ l de muestra. Para la separación de las diferentes fracciones se utilizaron dos columnas pL gel (poliestireno-divinilbenceno) (Hewlett-Packard), de 5 μ m de tamaño de partícula y 500 y 100 Å de tamaño de poro respectivamente, conectadas en serie y termostatizadas a 40°C. La fase móvil estaba compuesta por tetrahidrofurano (THF) de calidad para HPLC con un flujo de trabajo de 1 ml/min. La concentración de la muestra fue de 10-15 mg/ml en THF. La detección de las diferentes fracciones se realizó mediante un detector de índice de refracción Hewlett-Packard 1037A. Todos los disolventes y las muestras

fueron filtrados antes de su análisis con la ayuda de filtros de 2 μm de diámetro de poro.

Dichas determinaciones se efectuaron en el Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC) de Sevilla, gracias a la colaboración de las Dras. Carmen Dobarganes y Carmen Pérez-Camino.

III.1.3.3.2 ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RESPUESTA DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS DE LOS ACEITES.

Con la finalidad de conocer ciertos aspectos relacionados con el control de calidad de la técnica de HPSEC, p.e. linealidad de la respuesta, factores de respuesta, se llevaron a cabo curvas de calibrado con sustancias patrón.

* Sustancias patrón empleadas.

- Triglicéridos: tripalmitina, triestearina, trioleína y trilinoleína.
- Diglicéridos: dipalmitina, diestearina, dioleína y dilinoleína.
- Monoglicéridos: monopalmitina, monoestearina, monooleína y monolinoleína.
- Ácidos grasos: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido linoleico (C18:2).

Todos estos patrones fueron suministrados por Sigma Co. (Alcobendas, Madrid) y tenían garantía de pureza superior al 99%, lo que fue corroborado mediante HPSEC por la existencia de un único pico cromatográfico.

Dado que los cuatro ácidos grasos mayoritarios de los aceites vegetales, son ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido linoleico (C18:2), se procedió a realizar, para cada uno de los cuatro tipos de compuestos empleados (triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres), mezclas de los patrones tal como se comenta a continuación.

* Triglicéridos.

Se preparó una disolución compuesta por:

100,7 mg de tripalmitina, 101,6 mg de triestearina, 106,9 mg de trioleína y 112,4 mg de trilinoleína (total = 421,6 mg de triglicéridos) que se disolvieron en 10 ml de THF calidad para HPLC.

A partir de esta disolución se realizaron diferentes diluciones cuya concentración se encontraba entre 0,11 y 42,2 mg/ml de THF.

Las diferentes disoluciones se analizaron mediante HPSEC obteniéndose la recta de calibrado al representar las áreas de los picos en función de los μg inyectados de triglicéridos.

La recta obtenida se representa en la figura 37.

El ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos proporcionó la siguiente ecuación de la recta de calibrado:

$$\text{Area} = 13550 \cdot [\mu\text{g inyectados}] + 95360 \quad [1]$$

$$N=14; R=0,9995; T \text{ STD}=108,1$$

$$F_{1,12} \text{ SND}=11690; F_{1,12}(\alpha=0,01)=9,33$$

Como $F_{1,12}$ experimental es mayor que $F_{1,12}(\alpha=0,01)$, se puede decir que la ecuación [1] tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de dicha ecuación resultó ser no significativa con un 99% de significancia por la aplicación del test t de Student.

* Diglicéridos.

Se preparó una disolución compuesta por:

100 mg de dipalmitina, 100 mg de diestearina, 100 mg de dioleína y 100 mg de dilinoleína (total = 400 mg de diglicéridos) en 10 ml de THF calidad para HPLC.

A partir de esta disolución se realizaron diferentes diluciones cuya concentración oscilaba entre 0,1 y 40 mg/ml de THF.

La recta de calibrado se obtuvo de la misma forma que en el caso de los triglicéridos. Dicha recta se representa en la figura 38.

Figura 37.- Mezcla de triglicéridos analizados mediante HPS
Recta de calibrado.

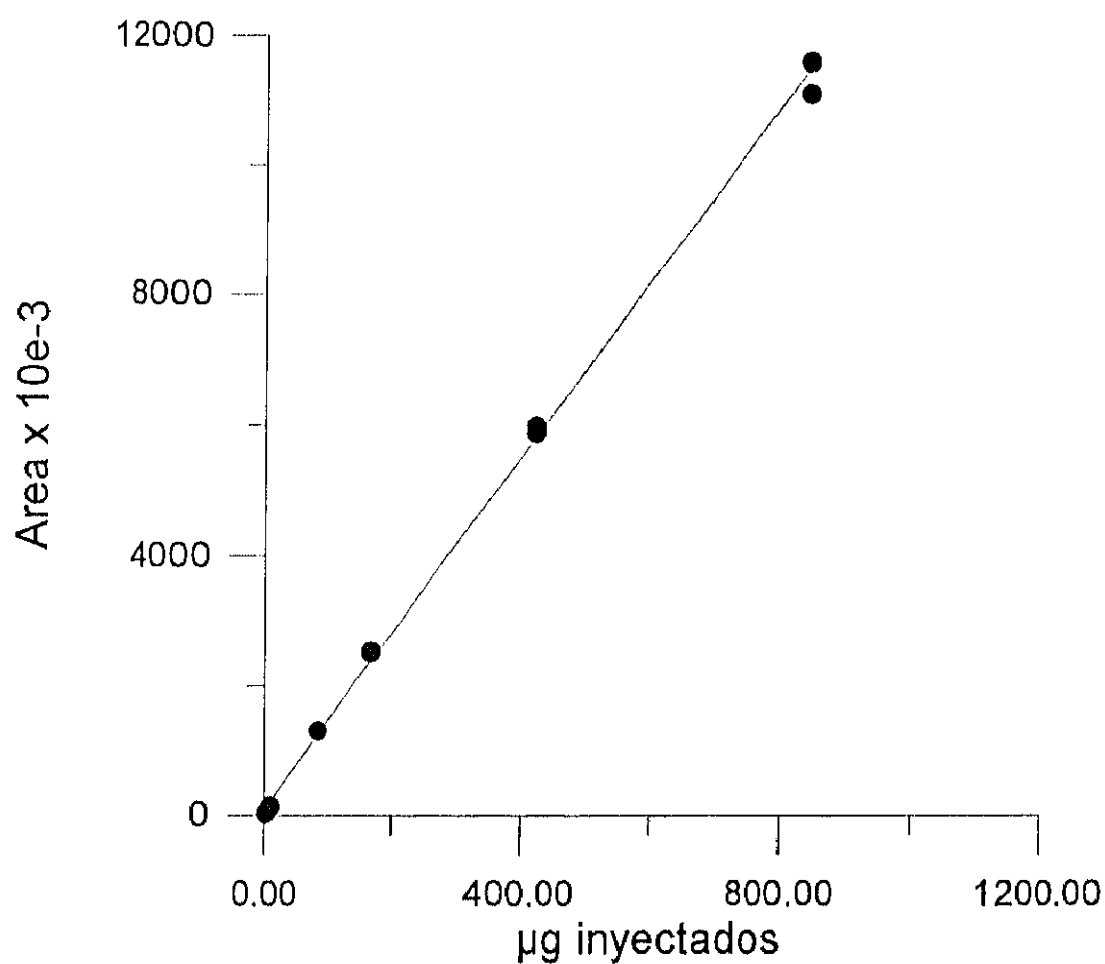
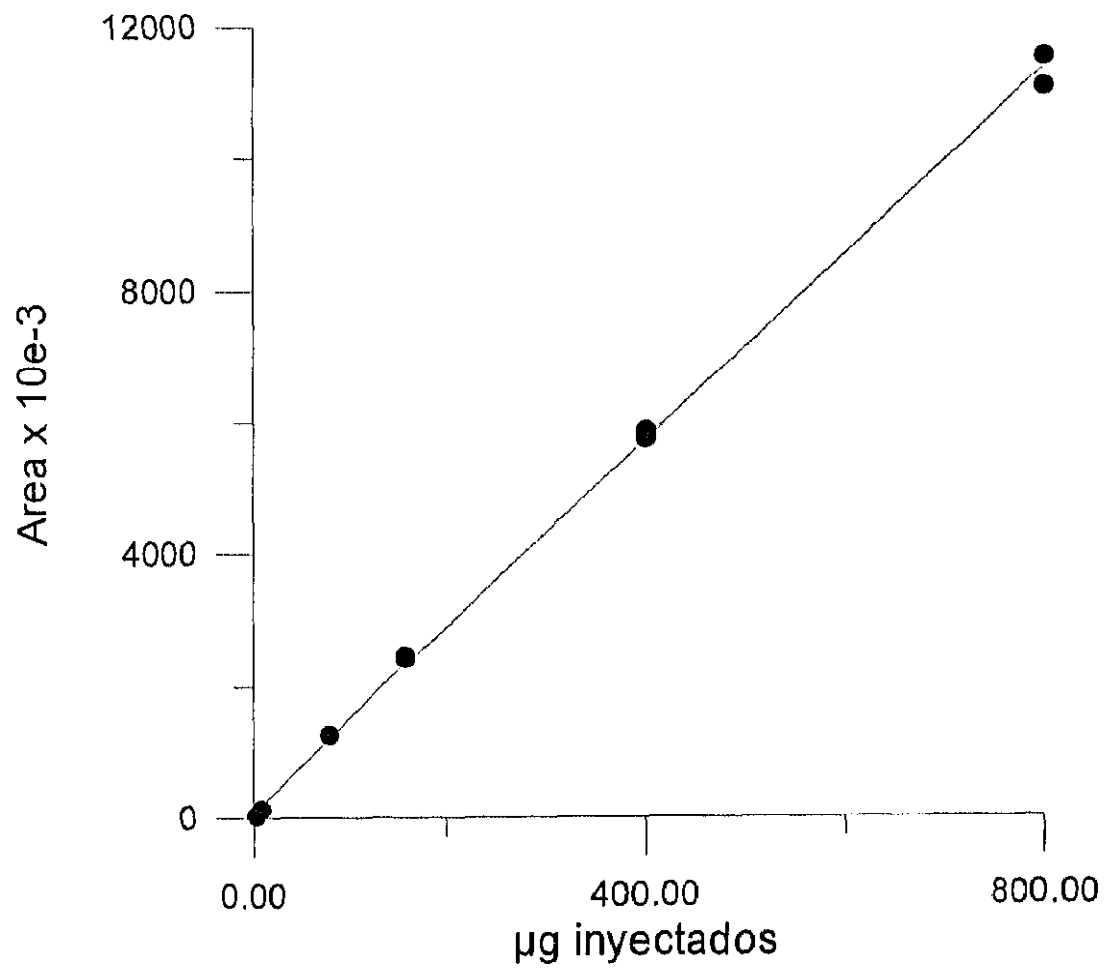


Figura 38.- Mezcla de diglicéridos analizados mediante HPSEC
Recta de calibrado.



El ajuste por mínimos cuadrados dió la siguiente ecuación:

$$\text{Area} = 14110 \cdot [\mu\text{g inyectados}] + 82130 \quad [2]$$

$$N=13; R= 0,9995; T \text{ STD} = 108,2$$

$$F_{1,11} \text{ SND} = 11700; F_{1,11}(\alpha=0,01) = 9,65$$

Como $F_{1,11}$ SND experimental es mayor que $F_{1,11}(\alpha=0,01)$, la ecuación tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de la ecuación resultó no ser significativa con un 99% de significancia por la aplicación del test t de Student.

* Monoglicéridos.

Se preparó una disolución compuesta por:

100 mg de monopalmitina, 100 mg de monoestearina, 100 mg de monooleína y 100 mg de monolinoleína (total= 400 mg de monoglicéridos) que se disolvieron en 10 ml de THF.

Se realizaron diferentes diluciones de esta solución cuyas concentraciones iban desde 0,1 a 40 mg/ml de THF.

La recta de calibrado se obtuvo de la misma forma que en los dos casos anteriores. Dicha recta se representa en la figura 39.

El ajuste por mínimos cuadrados de la recta se expresa mediante la siguiente ecuación:

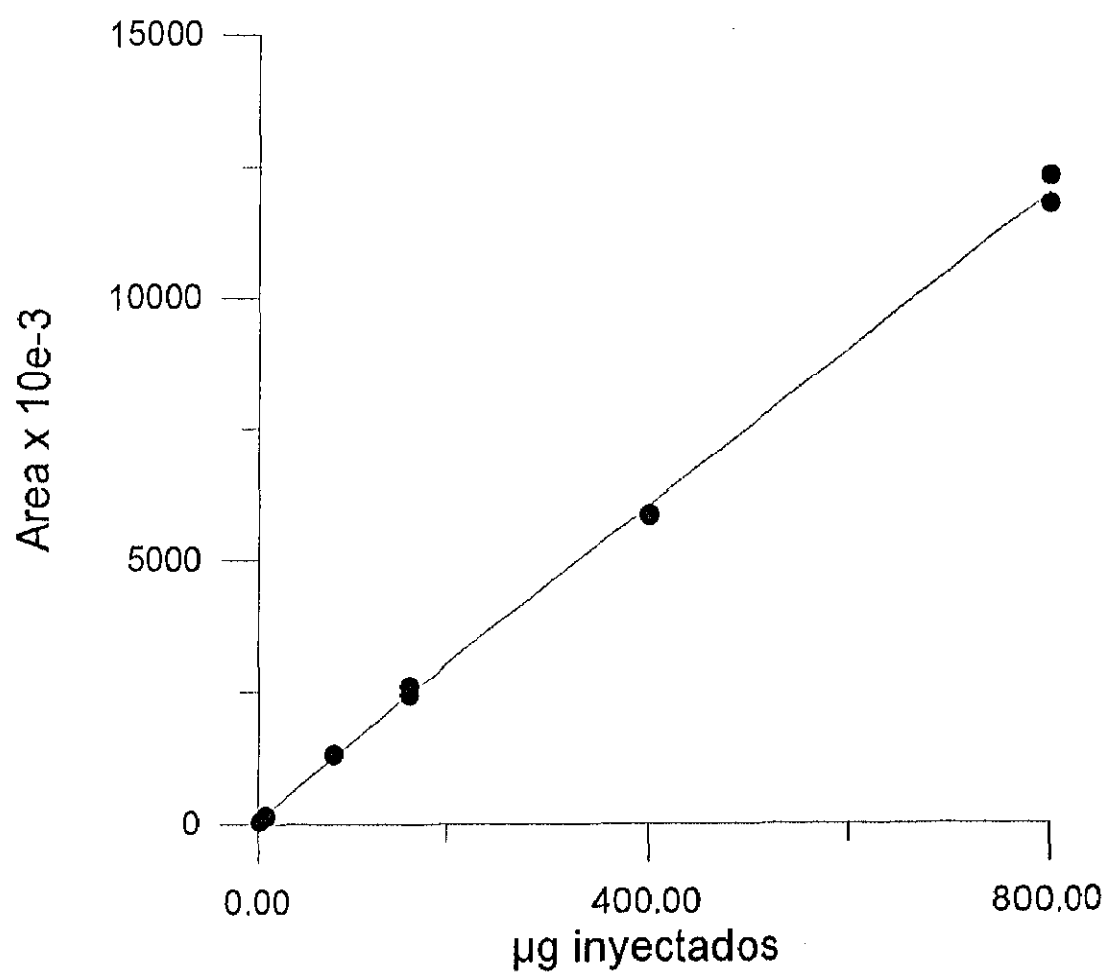
$$\text{Area} = 14880 \cdot [\mu\text{g inyectados}] + 55090 \quad [3]$$

$$N=14; R= 0.9994; T \text{ STD} = 98,61$$

$$F_{1,12} \text{ SND} = 9725; F_{1,12}(\alpha=0,01) = 9,33$$

Como $F_{1,12}$ experimental es mayor que $F_{1,12}(\alpha=0,01)$, se puede decir que la ecuación [3] tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de dicha ecuación resultó ser no significativa con un 99% de significancia por la aplicación del test t de Student.

Figura 39.- Mezcla de monoglicéridos analizados mediante HPSEC.
Recta de calibrado.



* Ácidos grasos libres.

Se preparó una disolución compuesta por:

100,9 mg de ácido palmítico, 100 mg de ácido esteárico, 103,2 mg de ácido oleico y 104,4 mg de ácido linoleico (total= 408,5 mg de ácidos grasos) disueltos en 10 ml de THF.

A partir de esta disolución se realizaron diferentes diluciones cuyas concentraciones oscilaban entre 0,1 y 40,9 mg/ml de THF.

La recta de calibrado se obtuvo de la misma forma que para el resto de los compuestos. Esta recta se representa en la figura 40.

El ajuste por mínimos cuadrados de la recta de calibrado dió la siguiente ecuación:

$$\text{Area} = 11970 \cdot [\mu\text{g inyectados}] + 981 \quad [4]$$

$$N=14; R= 0,9999; T \text{ STD} = 268,4$$

$$F_{1,12} \text{ SND} = 72020; F_{1,12}(\alpha=0,01) = 9,33$$

Como $F_{1,12}$ SND experimental es mayor que $F_{1,12}(\alpha=0,01)$, la ecuación tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de la ecuación resultó no ser significativa con un 99% de significancia por la aplicación del test *t* de Student.

III.1.4 TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Para el estudio estadístico de la alteración de los aceites, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA de una vía) de muestras repetidas seguido del test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones, estableciéndose el nivel mínimo de significancia en el 5% que se expresará en todos los casos señalando $p < 0,05$. Además se utilizó el test de las correlaciones producto-momento de Pearson.

Dicho estudio estadístico se realizó con la ayuda del programa Epistat (Tracy y Gustafson, 1987).

III.2.3.2.2.3 Determinación de la composición en ácidos grasos de los aceites.

La determinación de la composición en ácidos grasos de las muestras de oleína de palma procedentes de diferentes frituras se realizó a partir de los ésteres metílicos mediante la técnica de cromatografía gaseosa que fue descrita en el apartado III.1.3.2.1.2 para el aceite de girasol. Dicha determinación se realizó a partir de la fracción de ésteres metílicos no alterados. Esto es debido a que, según algunos autores (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a; Pérez-Camino, 1986; Sánchez-Muniz y col., 1989), de esta forma se evita la contaminación de la columna y del detector del cromatógrafo de gases, producida por los ácidos grasos oxidados, los dímeros de ácidos grasos y los compuestos de elevado peso molecular presentes en la muestra alterada que no eluyen en las condiciones de análisis.

Para el análisis cuantitativo de la composición en ácidos grasos de las diferentes muestras, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Acido (mg/100 mg de aceite)} = \frac{\% \text{ de ácido} * \% \text{ de E.M. no alterados}}{100}$$

Según esta expresión, la cantidad de cada uno de los ácidos grasos presentes en el aceite, dependen de su composición porcentual y de la cantidad de ésteres metílicos no alterados de dicho aceite (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a). Esta fórmula se aplicó ya que según Pérez-Camino (1986), produce resultados similares a los obtenidos usando patrón interno.

III.2.3.3 **Métodos analíticos que cuantifican los compuestos específicos de la alteración.**

III.2.3.3.1 DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE LA ALTERACION TERMOOXIDATIVA E HIDROLITICA.

Esta determinación se realizó mediante una combinación de las técnicas de cromatografía de adsorción en columna y de HPSEC. Dicha determinación ha sido ya descrita anteriormente en el apartado III.1.3.3.1 para el aceite de girasol. En dicho apartado

III.2 FRITURA DE PATATAS EN OLEINA DE PALMA. ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA DESPUES DE SUCESIVAS FRITURAS SIN RENOVACION DE ACEITE.

III.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL. CONDICIONES DE FRITURA.

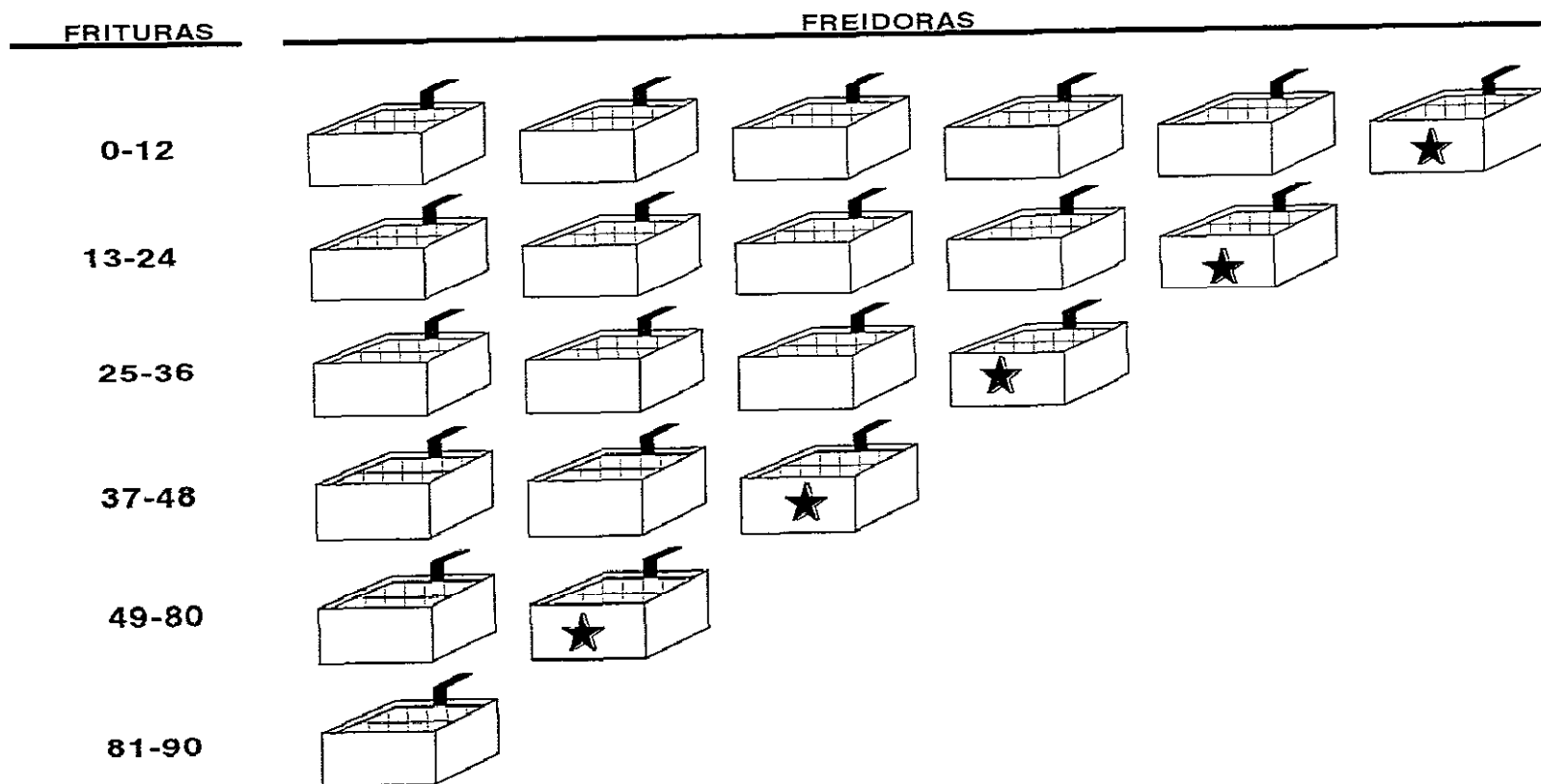
En el presente estudio, para la realización de las diferentes frituras se utilizó como **grasa culinaria oleína de palma**, la cual nos fue cedida por AGRA S. A. (Bilbao) y como alimento a freír se escogieron patatas nuevas (variedad Kennebec). Las condiciones de fritura establecidas fueron las mismas que las descritas para el aceite de girasol (apartado III.1.1): freidoras domésticas de 3 litros de capacidad en cada una de las cuales se pusieron 500 g de patatas peladas, limpias y secas, cortadas en rodajas finas de **aproximadamente 2 mm** de espesor. La relación grasa culinaria/alimento fue por tanto de 3 l/500 g.

El sistema seguido en este caso fue la realización de frituras sucesivas de patatas sin adición de aceite fresco, de esta forma, se efectuaron 90 frituras de forma repetida. Para poder llevar a cabo dicho experimento se partió de seis freidoras diferentes y, cada diez frituras, se eliminó una de ellas y con su aceite se completó el volumen de las restantes (figura 41). Lamentablemente, a partir de la fritura 70, el volumen de grasa en las freidoras fue inferior a 3 l, sin embargo, adaptando la cantidad de patatas al volumen de las freidoras en todos los casos, se mantuvo constante la relación grasa/alimento.

De igual forma que para el aceite de girasol (apartado III.1.1), el alimento se añadió cuando el aceite alcanzó una temperatura estable de 180°C, siendo la duración de cada fritura de ocho minutos. La temperatura de las freidoras se controló durante los minutos 1º, 2º, 5º, 6º y 8º de fritura mediante termómetros graduados de 0 a 200°C.

Durante el estudio, se realizaron diez frituras de patatas diarias divididas en dos series de cinco frituras cada una y separadas por un periodo de enfriamiento del aceite de cinco horas. Después de cada día, el aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente, en la que permaneció hasta el día siguiente. Por tanto, se llevaron a cabo noventa frituras repetidas de patatas de forma discontinua y sin adición de aceite fresco. El tiempo total de calentamiento del aceite puede calcularse en aproximadamente treinta horas.

Figura 41.- Esquema experimental de frituras realizadas en oleína de palma sin recambio de aceite.



FREIDORA ELIMINADA. SU CONTENIDO PASA A COMPLETAR EL VOLUMEN DE LAS OTRAS FREIDORAS

En la tabla 2 aparece un resumen de las condiciones del proceso de fritura empleadas en el presente estudio.

Tabla 2. Condiciones del proceso de fritura de patatas en oleína de palma.

Variables	
Grasa culinaria	Oleína de palma
Modalidad de fritura empleada	Sin recambio de aceite
Número de freidoras	Seis
Material del recipiente	Aluminio
Capacidad del recipiente	3 l
Cantidad de patatas por fritura	500 g*
Tipo de calentamiento	Discontinuo
Temperatura inicial del aceite	180°C
Tiempo de fritura	90 periodos de 8 minutos durante 9 días
Tiempo total de fritura	≈ 30 horas
Muestras de aceite seleccionadas procedentes de la fritura nº	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90

* la cantidad de patatas por fritura no siempre fueron 500 g, sin embargo, se mantuvo constante la relación grasa culinaria/alimento en 6:1 (3 l/500 g).

III.2.2 RECOGIDA Y PREPARACION DE LOS ACEITES.

Durante la realización del experimento se tomaron alícuotas de 50 ml de la oleína de palma de partida y después de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 , 80, y 90 frituras de patatas respectivamente.

Las muestras una vez frías se guardaron bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su posterior análisis.

III.2.3 ANALISIS DE LOS ACEITES. MEDIDA DE LA ALTERACION

Con el fin de conocer y cuantificar la alteración producida como consecuencia de la fritura en la oleína de palma objeto de nuestro estudio, se realizó el análisis tanto de las muestras de aceite sin usar como en las procedentes de diferentes frituras de patatas.

Los métodos de análisis utilizados han sido clasificados en:

- 1.- Índices físico-químicos de carácter general.
- 2.- Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.
- 3.- Métodos analíticos que cuantifican los compuestos específicos de la alteración.

III.2.3.1 Índices analíticos de carácter general.

III.2.3.1.1 INDICE DE REFRACCION.

Este índice se determinó siguiendo la Norma UNE 55-015 (1958). La técnica empleada en este estudio es la misma que la seguida para el aceite de girasol en el apartado III.1.3.1.1 de esta Memoria.

Las muestras utilizadas fueron la oleína de palma sin usar y después de ser utilizadas 40 y 90 veces, respectivamente, para freír patatas.

III.2.3.1.2 DETERMINACION DE LA ACIDEZ LIBRE.

Se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en la Norma UNE 55-011 (1964). La metodología que se siguió fue la misma que la descrita en el apartado III.1.3.1.2 para el aceite girasol. Sin embargo la expresión de los resultados es diferente ya que en el caso de la oleína de palma el grado de acidez no se expresa en relación al ácido oleico sino al ácido palmítico (Norma UNE 55-034, 1964) y viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Acido palmítico}(\%) = \frac{25,6 * V * N}{G}$$

siendo:

G= Peso de la materia grasa, en gramos.

V= Volumen consumido de la disolución de hidróxido potásico, expresado en mililitros.

N= Normalidad de la disolución alcalina utilizada.

III.2.3.1.3 PRUEBA COLORIMETRICA DE PEREVALOV MODIFICADA.

Esta prueba colorimétrica se realizó siguiendo las modificaciones de Meyer (1979).

* Reactivos necesarios:

Hidróxido sódico (Panreac), alcohol bencílico (Merck), n-propanol (Panreac), azul de bromotimol (Merck), dioxano (Panreac) trietanolamina (Panreac) y ácido acético glacial (Panreac).

* Procedimiento operativo.

Se disolvieron 1,5 ml de oleína de palma en 3,5 ml de una mezcla al 2% de NaOH en alcohol bencílico y n-propanol (1:3). A continuación se añadieron 0,11 ml de una disolución al 0,1% de azul de bromotimol en dioxano, que contenía un 1% de cantidades

equimolares de trietanolamina y ácido acético glacial. Después de agitar la mezcla, se valoró la coloración que aparecía a los dos minutos (Meyer, 1979).

III.2.3.2 Métodos analíticos para la evaluación de la alteración total.

III.2.3.2.1 DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS TRIGLICERIDOS NO ALTERADOS Y DE COMPUESTOS POLARES DEL ACEITE.

El contenido de triglicéridos no alterados y de compuestos polares de la oleína de palma sin usar y después de diferentes frituras de patatas se determinó mediante la cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice. El procedimiento seguido fue el mismo descrito para el aceite de girasol (apartado III.1.3.2.2). De la misma forma, la eficacia de la separación cromatográfica se comprobó mediante cromatografía en capa fina según las condiciones descritas en dicho apartado.

III.2.3.2.2 DETERMINACION DE LOS RESTOS ACILO ALTERADOS Y NO ALTERADOS.

La separación de los restos acilo alterados de los no alterados se llevó a cabo mediante la cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice. Después de la saponificación y metilación de la oleína de palma con diferente grado de alteración, se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en dichas muestras.

III.2.3.2.2.1 Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

El fundamento de esta técnica es la saponificación de los glicéridos, y la liberación y esterificación de los ácidos grasos mediante metanol en presencia de trifluoruro de boro (IUPAC, 1987a).

*** Reactivos:**

NaOH, NaCl y benceno (Panreac); metanol y hexano (Carlo Erba); trifluoruro de boro al 20% en metanol (Merck).

*** Procedimiento operativo:**

Se pesó 1 g de grasa en un matraz de 100 ml de cuello largo y boca esmerilada al que se añadieron 40 ml de NaOH 0,5 N en metanol. Dicha mezcla se calentó a 60°C en un baño a reflujo durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se adicionaron en el matraz 20 ml de benceno y 40 ml de una disolución de trifluoruro de boro al 20% en metanol calentándose de nuevo la mezcla en un baño a reflujo a 90°C durante 60 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar el matraz hasta temperatura ambiente y se añadieron 15 ml de una disolución sobresaturada de NaCl.

La extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó con 20 ml de hexano, repitiéndose la operación cinco veces. Finalmente, el disolvente se evaporó en un rotavapor con baño de agua a 35°C, bajo corriente de nitrógeno.

III.2.3.2.2 Separación de los ésteres metílicos alterados de los no alterados.

Esta separación, como ya se ha dicho anteriormente, se realizó mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice. La preparación de la columna y el procedimiento operativo fueron similares a los descritos en el apartado III.1.3.2.2 para la determinación de los compuestos polares en el aceite de girasol. La única diferencia consistió en la proporción de la mezcla de hexano/eter etílico utilizada como primer eluyente de la columna que en este caso fue de 95:5 y que la muestra a separar no era aceite sino los ésteres metílicos de sus ácidos grasos.

Por tanto, este método permitió separar los ésteres metílicos de los ácidos no alterados (que eluyeron los primeros), de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que habían sufrido algún tipo de alteración durante la fritura.

III.2.3.2.2.3 Determinación de la composición en ácidos grasos de los aceites.

La determinación de la composición en ácidos grasos de las muestras de oleína de palma procedentes de diferentes frituras se realizó a partir de los ésteres metílicos mediante la técnica de cromatografía gaseosa que fue descrita en el apartado III.1.3.2.1.2 para el aceite de girasol. Dicha determinación se realizó a partir de la fracción de ésteres metílicos no alterados. Esto es debido a que, según algunos autores (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a; Pérez-Camino, 1986; Sánchez-Muniz y col., 1989), de esta forma se evita la contaminación de la columna y del detector del cromatógrafo de gases, producida por los ácidos grasos oxidados, los dímeros de ácidos grasos y los compuestos de elevado peso molecular presentes en la muestra alterada que no eluyen en las condiciones de análisis.

Para el análisis cuantitativo de la composición en ácidos grasos de las diferentes muestras, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Acido (mg/100 mg de aceite)} = \frac{\% \text{ de ácido} * \% \text{ de E.M. no alterados}}{100}$$

Según esta expresión, la cantidad de cada uno de los ácidos grasos presentes en el aceite, dependen de su composición porcentual y de la cantidad de ésteres metílicos no alterados de dicho aceite (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a). Esta fórmula se aplicó ya que según Pérez-Camino (1986), produce resultados similares a los obtenidos usando patrón interno.

III.2.3.3 **Métodos analíticos que cuantifican los compuestos específicos de la alteración.**

III.2.3.3.1 DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE LA ALTERACION TERMOOXIDATIVA E HIDROLITICA.

Esta determinación se realizó mediante una combinación de las técnicas de cromatografía de adsorción en columna y de HPSEC. Dicha determinación ha sido ya descrita anteriormente en el apartado III.1.3.3.1 para el aceite de girasol. En dicho apartado

se explicaba que los análisis se realizaron en el Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC) de Sevilla. Posteriormente, nuestro grupo investigador adquirió un equipo de HPSEC en el que se realizaron el resto de las determinaciones indicadas en la presente Memoria.

* Procedimiento operativo.

La fracción polar de los diferentes aceites, obtenida previamente mediante cromatografía en columna, se analizó mediante HPSEC.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Waters 501 (Milford, Massachusetts) con un *loop* de 20 μ l de muestra. La separación de las diferentes fracciones se efectuó utilizando dos columnas pL gel (poliestireno-divinilbenceno) (Hewlett-Packard), de 5 μ m de tamaño de partícula y, 500 Å y 100 Å de tamaño de poro respectivamente, conectadas en serie y termostatizadas a 40°C. La fase móvil estaba compuesta por THF de calidad para HPLC desgasificado mediante helio y con un flujo de trabajo de 1 ml/min. La concentración de la muestra fue de 10-15 mg/ml en THF. La detección de las diferentes fracciones se realizó mediante un detector de índice de refracción Waters 410. Todos los disolventes y las muestras fueron filtrados antes de su análisis con la ayuda de filtros de 2 μ m de diámetro de poro.

III.2.3.3.1.1 Estudio del factor de respuesta de los componentes polares de la oleína de palma.

Con la finalidad de conocer el factor de respuesta en el detector de índice de refracción de las diferentes fracciones polares pertenecientes a todas las muestras de oleína de palma estudiadas en la presente Memoria, para estudiar la posible influencia en dicho factor de la presencia de diferentes cantidades de polímeros y dímeros de triglicéridos, se procedió a la obtención de la recta de calibrado correspondiente a la totalidad de dichas muestras. Dicha recta, por tanto, se obtuvo a partir de las fracciones polares de 73 muestras diferentes de oleína de palma con distinto grado de alteración y con un intervalo de concentración de muestra (μ g inyectados) situado entre 150 y 750 μ g.

La recta de calibrado obtenida es la que aparece en la figura 42. El ajuste por mínimos cuadrados de la recta de calibrado responde a la siguiente ecuación:

$$\text{Area} = 12640 \cdot [\mu\text{g inyectados}] + 44050 \quad [5]$$

$$N=73; R= 0,9944; T \text{ STD} = 79,45$$

$$F_{1,71} \text{ SND} = 6312; F_{1,71}(\alpha=0,01) = 7,01$$

Como $F_{1,71}$ experimental es mayor que $F_{1,71}(\alpha=0,01)$, se puede decir que la ecuación [5] tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de dicha ecuación resultó ser no significativa con un 99% de certeza por la aplicación del test *t* de Student.

III.2.4 TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Para el estudio estadístico de la alteración de los aceites, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA de una vía) de muestras repetidas seguido del test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones, estableciéndose el nivel mínimo de significancia en el 5% que se expresará en todos los casos señalando $p < 0,05$. Además se utilizó el test de las correlaciones producto-momento de Pearson.

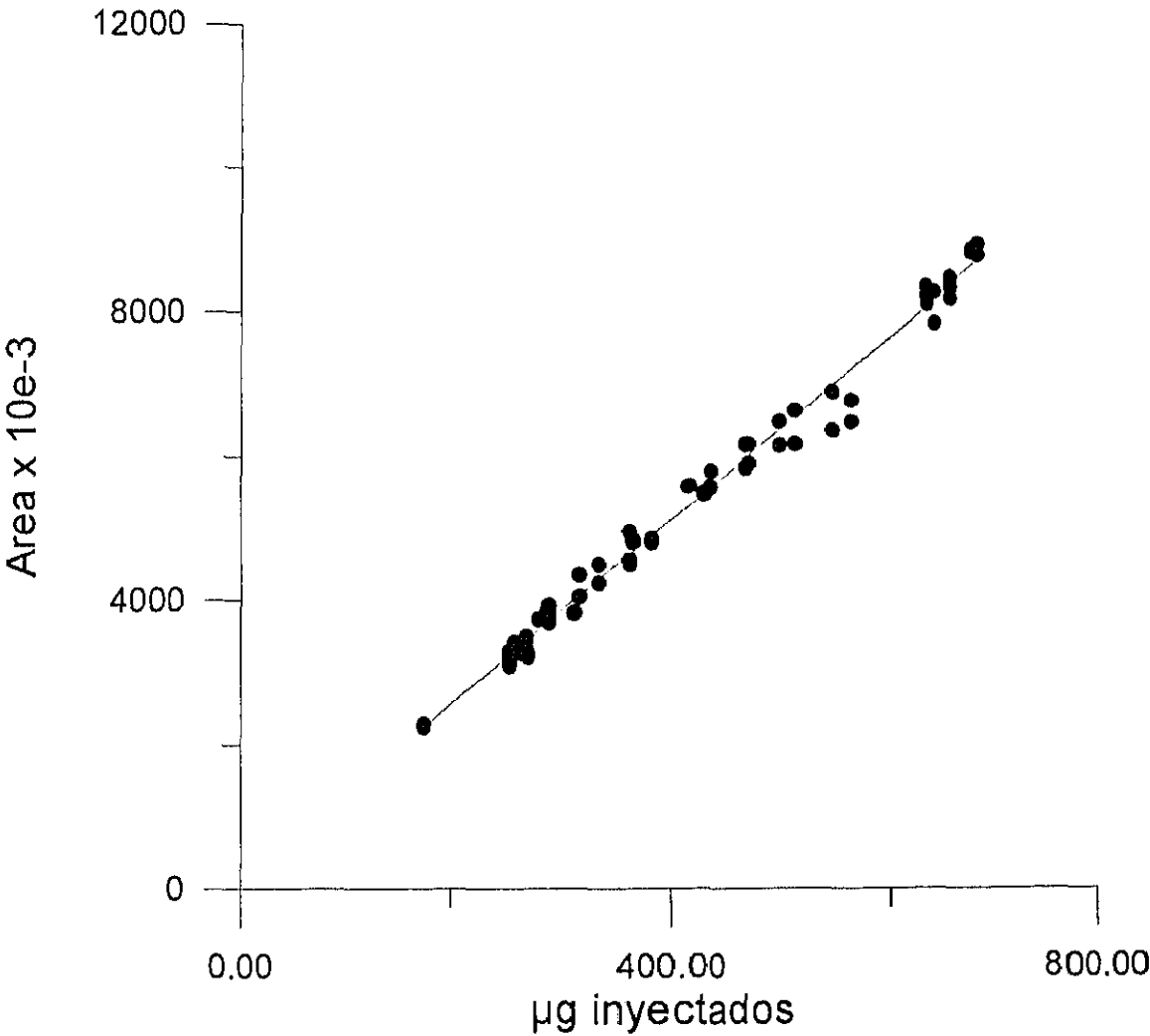
Dicho estudio estadístico se realizó con la ayuda del programa Epistat (Tracy y Gustafson, 1987).

Además se realizó un análisis factorial en componentes mayoritarios de las diferentes determinaciones realizadas. Este análisis se realizó con la ayuda de D^a Laura Barrios, Jefe del Dpto. de Estadística del Centro Técnico de Informática CTI-CSIC, en un VAX 9210-VMS del CTI-CSIC con el paquete de programas BMDP.

Dicho estudio es un análisis multivariante, que permite encontrar un número (*n*) de factores para explicar un número (*m*) de variables observables o medibles, siendo $m < n$.

Este método selecciona sucesivamente factores que explican la mayor parte de la varianza de las variables, lo que en definitiva, equivale a calcular los valores propios de la matriz de correlación.

Figura 42.- Fracciones de compuestos polares de oleína de palma analizadas mediante HPSEC. Recta de calibrado.



Dicho programa proporciona los factores sin rotar y rotados, realizándose la rotación que consiste en hallar una matriz de transformación de los mismos, de forma que se obtengan otros nuevos que cumplan la condición de que la suma de las simplificaciones de todos los factores nuevos sea máxima.

Los factores rotados son organizados en dicho programa estadístico por orden decreciente de la varianza explicada, siendo los factores rotados con valores inferiores a 0,250 reemplazados por cero.

III.3 LIPASA PANCREATICA *IN VITRO*. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Se realizó un estudio cinético de la actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina sobre diferentes sustratos con distinto grado de alteración, para comprobar si la actividad de dicha enzima digestiva se ve modificada por la presencia de productos termooxidados en el medio.

Las sustancias empleadas como sustrato de la lipasa pancreática porcina fueron aceites vegetales de uso alimentario (oleína de palma y aceite de girasol refinado) antes y después de su utilización en frituras repetidas de patatas. También se estudió la actividad de dicha lipasa pancreática frente a aceite de oliva virgen sin alterar.

Paralelamente, con objeto de tener un modelo simple del sistema estudiado, se realizaron estudios cinéticos similares de la actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina frente a sustancias patrón puras tales como trioleína y 1,3 dioleína, y sobre la fracción de triglicéridos no polares de la oleína de palma obtenidos mediante cromatografía de adsorción. De la misma forma, se determinó la actividad de la lipasa pancreática frente a dichas sustancias patrón termooxidadas después de su calentamiento en un reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

III.3.1 SUSTANCIAS PATRON.

Se realizaron estudios cinéticos de actividad enzimática sobre sustancias patrón, donde se puede diferenciar entre sustancias puras como trioleína y 1,3 dioleína, y la fracción de triglicéridos no alterados de la oleína de palma (TGOP) obtenidos mediante cromatografía en columna de sílice.

III.3.1.1 Caracterización de las sustancias patrón.

Trioleína y 1,3 dioleína fueron suministradas por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) con garantía de pureza superior al 99%.

Con objeto de caracterizar dichas sustancias, se realizó el espectro de absorción UV-visible de cada una de ellas disueltas en tetrahidrofurano (THF). Estos espectros se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu 2100, dotado de termostatización en las cubetas. Los ensayos se realizaron a 25°C y en un rango de longitud de onda entre 210 y 800 nm. Las concentraciones de las disoluciones utilizadas de trioleína y 1,3 dioleína en THF fueron de $2,0 \cdot 10^{-3}$ M y $2,4 \cdot 10^{-3}$ M respectivamente.

En ambos casos, se prepararon disoluciones de dichas sustancias patrón en THF con una concentración de $7,8 \cdot 10^{-3}$ M en el caso de la trioleína y de $6,4 \cdot 10^{-3}$ M para la 1,3 dioleína. A partir de esas disoluciones iniciales se realizaron diferentes diluciones, midiéndose la absorbancia de todas ellas a 232 nm frente al THF usado como referencia.

El ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos proporcionó las ecuaciones siguientes, donde la concentración está expresada en Molaridad:

Trioleína:

$$\text{Abs} = 81,3 \cdot [\text{CONC}] - 0,0085 \quad [6]$$

$$N=7 \quad R=0,9935 \quad T \text{ STD} = 19,52$$

$$F_{1,5} \text{ SND} = 381,0 \quad F_{1,5}(\alpha=0,01) = 16,26$$

1,3 Dioleína:

$$\text{Abs} = 64,3 \cdot [\text{CONC}] + 0,0172 \quad [7]$$

$$N=8 \quad R=0,9686 \quad T \text{ STD} = 9,54$$

$$F_{1,6} \text{ SND} = 90,98 \quad F_{1,6}(\alpha=0,01) = 13,75$$

Como $F_{1,5}$ y $F_{1,6}$ experimentales son mayores que $F_{1,5}(\alpha=0,01)$ y $F_{1,6}(\alpha=0,01)$ respectivamente, se puede decir que las ecuaciones [6] y [7] tienen una significancia superior al 99%. La ordenada en las ecuaciones [6] y [7] resultó ser no significativa con un 99% de significancia según la aplicación del test *t* de Student. En las figuras 43 y 44 aparecen respectivamente las rectas de calibrado de trioleína y 1,3 dioleína.

Figura 43.- Absorbancia a 232 nm de la trioleína.
Recta de calibrado.

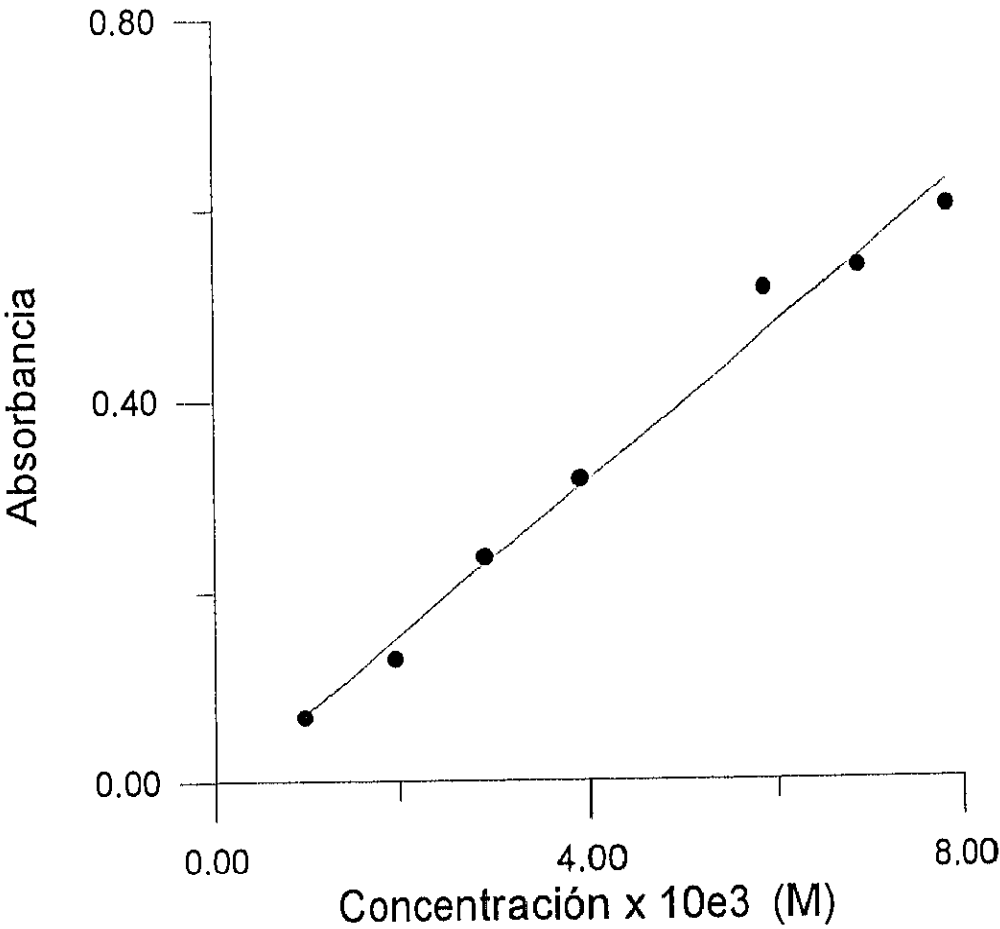
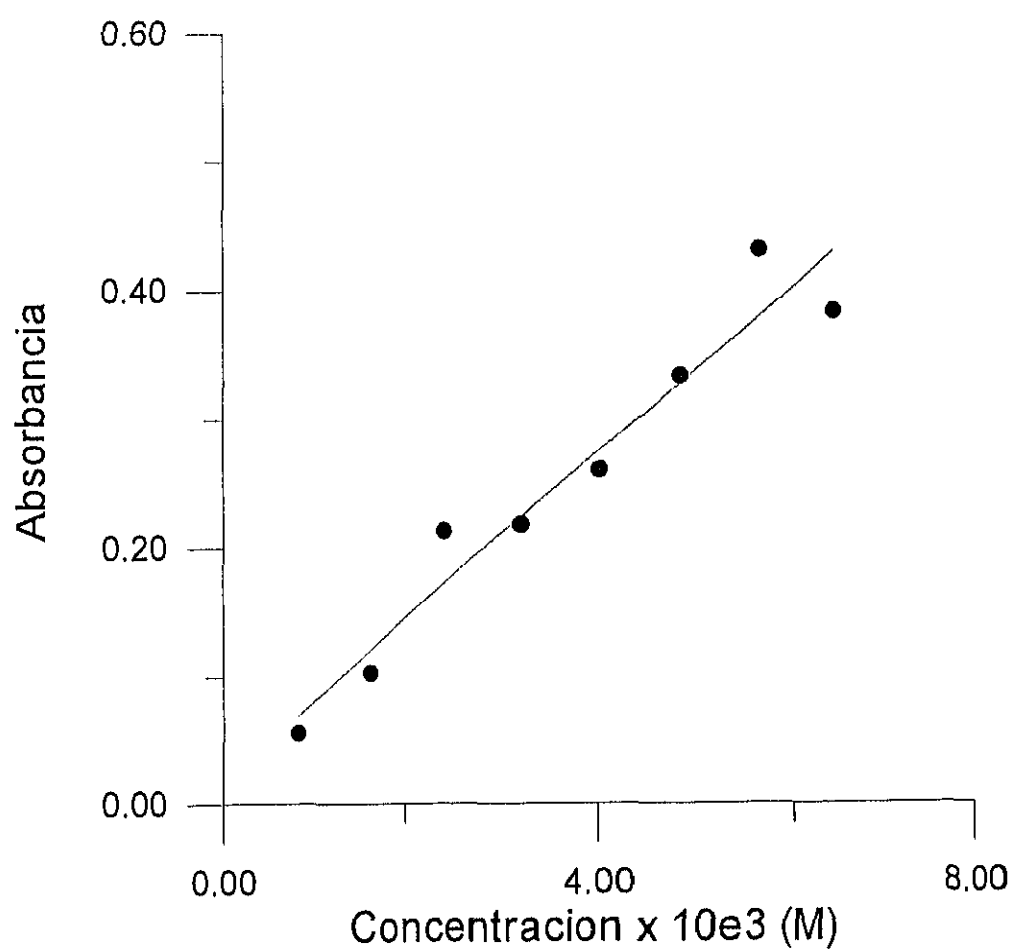


Figura 44.- Absorbancia a 232 nm de la 1,3 dioleina,
Recta de calibrado.



Los triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP) se obtuvieron por separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, a partir de la oleína de palma. El método usado fue el mismo que el descrito para la separación del aceite de girasol en el apartado III.1.3.2.2 de esta Memoria. De la misma forma descrita para el aceite de girasol, la eficacia de la separación cromatográfica se comprobó mediante cromatografía en capa fina.

Al igual que para la trioleína y la 1,3 dioleína, la fracción de TGOP se estudió mediante su espectro de absorción UV-visible en disolución de THF. Dicho espectro se realizó en el espectrofotómetro mencionado anteriormente y las condiciones de trabajo fueron las mismas que para dichas sustancias puras. La concentración empleada en este caso fue de $1,1 \cdot 10^{-3}$ M.

De la misma forma que para la trioleína y la 1,3 dioleína, se realizó una curva de calibrado donde se relacionaba la concentración con la absorbancia a $\lambda=232$ nm. La concentración de la disolución inicial preparada fue de $3,06 \cdot 10^{-3}$ M en THF de la que se realizaron diferentes diluciones y se midió la absorbancia de todas ellas a 232 nm frente a THF usado como referencia.

El ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos proporcionó la siguiente ecuación:

TGOP:

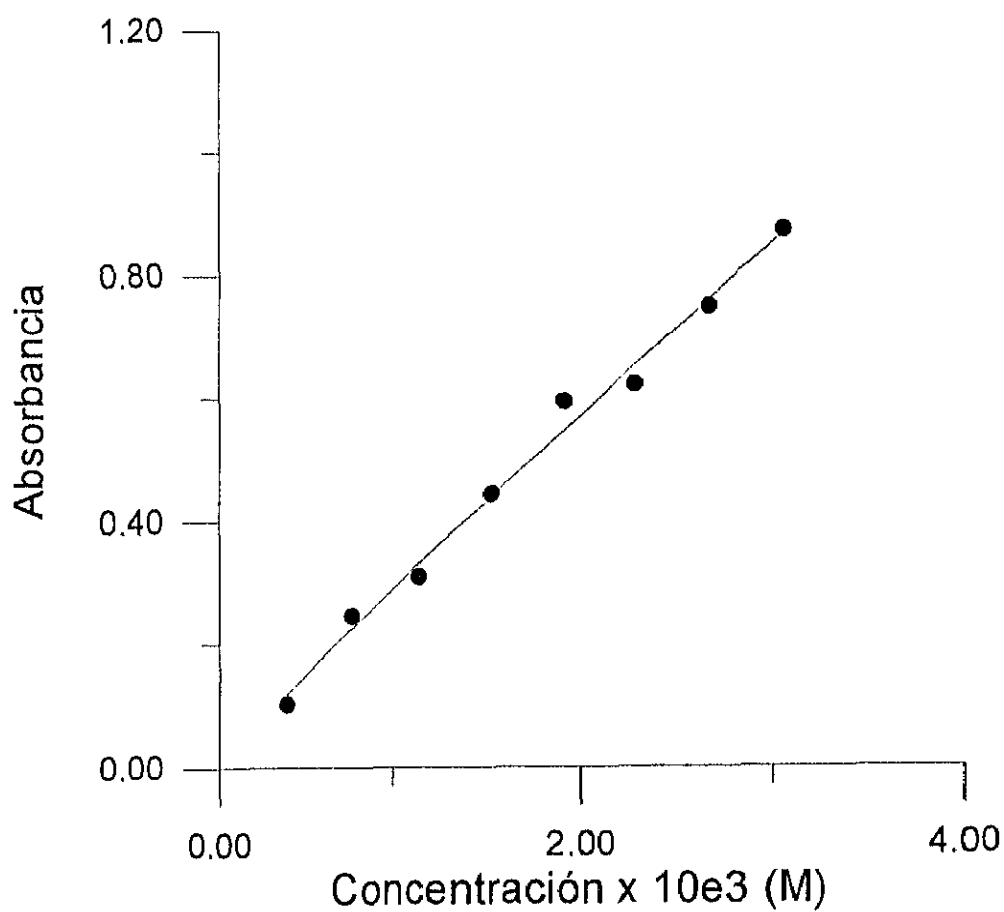
$$\text{Abs} = 278,2 \cdot [\text{CONC}] + 0,0125 \quad [8]$$

$$N=8 \quad R=0,9951 \quad T \text{ STD} = 24,75$$

$$F_{1,6} \text{ SND} = 612,8 \quad F_{1,6}(\alpha=0,01) = 13,75$$

Como $F_{1,6}$ experimental es mayor que $F_{1,6}(\alpha=0,01)$ se puede decir que la ecuación tiene una significancia superior al 99%. La ordenada de dicha ecuación resultó ser despreciable con un 99% de certeza mediante la aplicación del test t de Student. En la figura 45 se representa la recta de calibrado correspondiente.

Figura 45.- Absorbancia a 232 nm de los TGOP.
Recta de calibrado.



III.3.1.2 Alteración de las muestras.

La alteración de la trioleína, la 1,3 dioleína y de la fracción de triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP) se realizó mediante calentamiento de dichas muestras en un reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Para llevar a cabo dicha alteración, se depositaron 500 mg de cada una de las muestras en vasos de precipitado de 25 cc los cuales se sumergieron en un baño termostatzado que contenía aceite a 180°C. La alteración se realizó en presencia de oxígeno ya que los vasos de precipitado permanecieron en contacto con la atmósfera.

La alteración se realizó a diferentes tiempos dependiendo de la muestra: la 1,3 dioleína se calentó durante 1 hora, la trioleína durante 1 y 2 horas, y los TGOP se alteraron a lo largo de 1, 2 y 4 horas.

Las muestras alteradas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y a continuación se almacenaron a -20°C en atmósfera de nitrógeno hasta su posterior análisis.

III.3.1.3 Caracterización de las muestras termooxidadas.

Las muestras de trioleína, 1,3 dioleína y TGOP una vez termooxidadas, se procedió a su posterior caracterización para lo cual se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

1.- Composición en ácidos grasos. Se analizaron los ésteres metílicos de la muestra mediante cromatografía gaseosa realizándose de forma similar a lo descrito en el apartado III.1.3.2.1 para el aceite de girasol. Dicha determinación se llevó a cabo únicamente en los TGOP antes y después de su calentamiento.

2.- Análisis por medio de la combinación de técnicas de cromatografía de adsorción y de exclusión en el cual se incluía:

a) Determinación de los compuestos polares por medio de cromatografía en columna de sílice. Se realizó de forma similar al método usado para separar los compuestos polares del aceite de girasol tal como se describió en el apartado III.1.3.2.2, con la diferencia de que

en este caso la cantidad de muestra introducida en la columna fue de 500 mg. De la misma forma descrita para el aceite de girasol, la eficacia de la separación se comprobó mediante cromatografía en capa fina.

Dicha determinación se realizó únicamente para la trioleína y los TGOP mientras que en el caso de la 1,3 dioleína no fue posible.

b) Caracterización y cuantificación de los diferentes compuestos que forman el componente polar de las muestras. Para ello se analizaron las fracciones de compuestos polares de las muestras termooxidadas de trioleína y TGOP obtenidas previamente por cromatografía en columna [parte a) de este apartado]. Dicho análisis se realizó mediante HPSEC utilizando el método descrito anteriormente para el análisis de las fracciones polares de la oleína de palma en el apartado III.2.3.3 de esta Memoria.

Las muestras de 1,3 dioleína calentadas se caracterizaron también mediante HPSEC, sin embargo en este caso los análisis se realizaron sobre la muestra completa y no en la fracción alterada.

3.- Espectro característico de absorción UV-visible y medida de la absorbancia a 232 nm. Se realizó en el espectrofotómetro indicado anteriormente y en las mismas condiciones descritas para la trioleína y 1,3 dioleína en el apartado III.3.1.1.

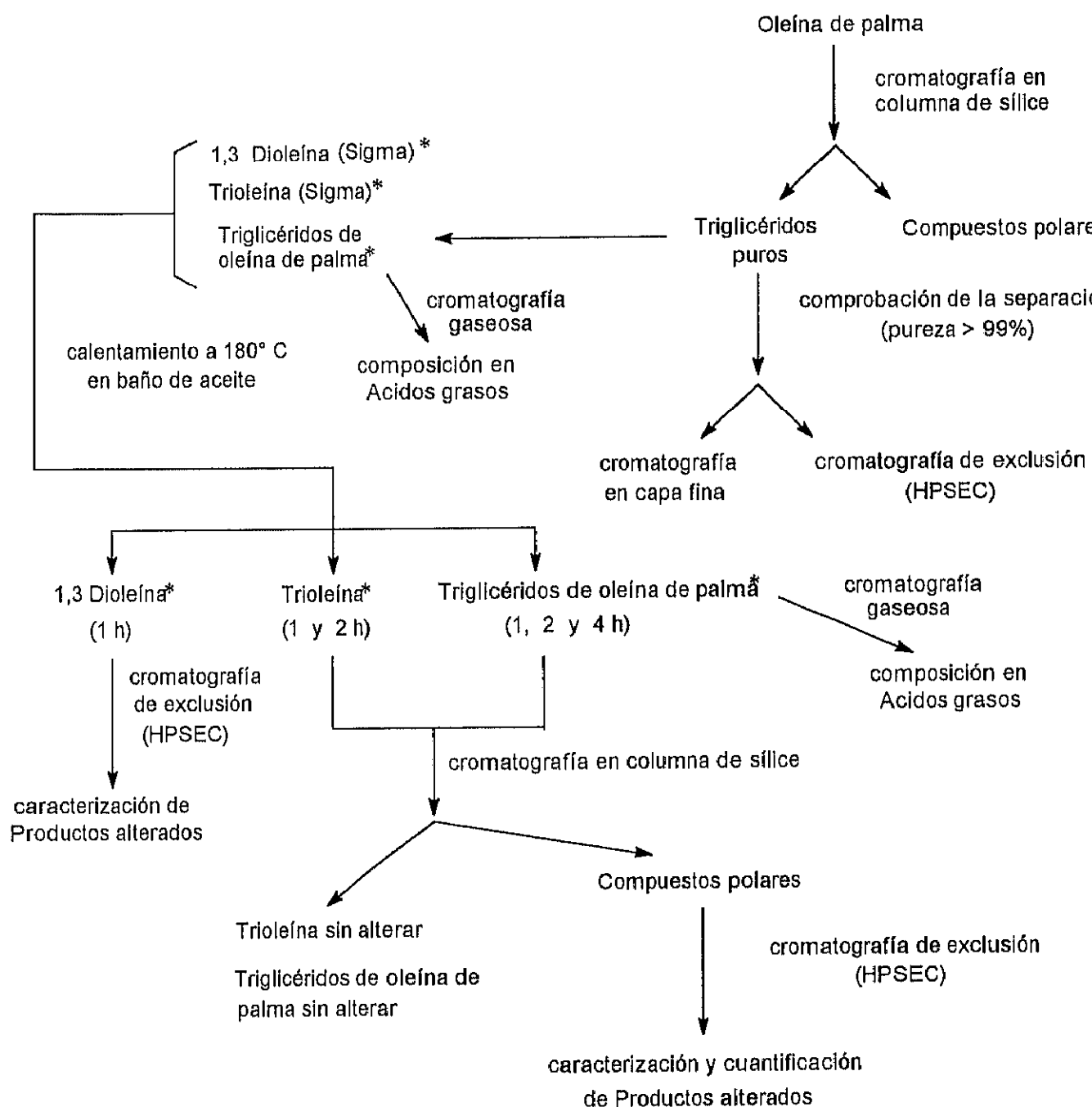
En la figura 46 se representa la caracterización y alteración de las sustancias patrón utilizadas en estos estudios, así como la caracterización de las muestras termooxidadas.

III.3.1.4 Determinación de la actividad lipásica.

Para llevar a cabo dicho estudio se determinó la actividad de la lipasa pancreática frente a distintos sustratos. Dicha medida de la actividad hidrolítica se llevó a cabo utilizando un método de valoración a pH fijo para la cuantificación de los productos de reacción.

Las determinaciones se realizaron en un pH-stato Metrohm (Herisau, Suiza) formado por las siguientes unidades: Impulsomat 614, Dosimat 665 (con agitador), pH-metro 691,

Figura 46.- Alteración de sustancias patrón y caracterización de las muestras termooxidadas.



* Espectro de absorción UV-visible y medida de absorbancia a 232 nm

electrodo combinado de pH estándar, ordenador NEAT N-386 con programa suministrado por Metrohm y conectado a una impresora Epson LX-400. El pH-stato estaba dotado de termostatación en la cubeta de reacción.

En un principio, se trabajó con las condiciones óptimas descritas para la lipasa de *Candida cylindracea* (Hernández, 1992) de: pH, temperatura, tipo de tampón (Tris, fosfato, etc.), fuerza iónica, concentración de NaOH valorante, concentración de la enzima y condiciones de emulsificación del sustrato, adaptándolas a nuestra enzima en concreto.

Una vez que fueron establecidas las condiciones idóneas de trabajo, se definió el ensayo estándar para los diferentes sustratos empleados.

III.3.1.4.1 ENSAYO ESTANDAR DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Reactivos:

Lipasa pancreática porcina (EC 3.1.1.3) tipo II (Sigma), Emulsión de aceite de oliva (Sigma), Tris hidroximetilaminometano (Merck), HCl (Merck), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Panreac), glicerol (Merck), goma arábiga (Sigma), NaOH (Panreac) y Bifalato ácido de potasio (May & Baker).

Condiciones del ensayo:

- **Enzima:** se utilizó una disolución de lipasa pancreática porcina en tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=8,3). La concentración de la disolución enzimática fue de 10 mg de lipasa/ml de tampón. Previamente a la utilización de la disolución enzimática, ésta se agitó durante 2 horas a 4°C con el fin de conseguir una máxima homogeneización.

- Sustratos:

- Emulsión de aceite de oliva (Sigma), la cual se utilizó para definir inicialmente un ensayo estándar de actividad lipásica.

- Trioleína, 1,3 dioleína y TGOP antes y después de su alteración mediante calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite. Dichos sustratos se emulsionaron mediante ultrasonidos con la ayuda de un sonicador Branson 450.

La emulsión en el caso de la trioleína y los triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP), antes y después de su alteración, se realizó sobre una mezcla de 3 ml compuesta por:

- 0,225 ml de sustrato (trioleína o TGOP)
- 0,675 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=8,3)
- 2,1 ml de solución emulsificante.

Cuando el sustrato de la lipasa fue la 1,3 dioleína, antes y después de su alteración, la composición de la mezcla de 3 ml a emulsionar fue la siguiente:

- 0,105 ml de 1,3 dioleína
- 0,795 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=8,3)
- 2,1 ml de solución emulsificante.

La solución emulsificante (100 ml) estaba formada por:

- 1,79 g de NaCl
- 0,041 g de KH_2PO_4
- 54 ml de glicerol
- 1 g de goma arábica
- agua bidestilada c.s.p. 100 ml

* Preparación de la emulsión:

La solución emulsificante se preparó en un matraz de 100 ml donde se pusieron en primer lugar el NaCl, el KH_2PO_4 y la goma arábica, añadiéndose a continuación el glicerol y un poco de agua bidestilada. La mezcla se agitó cuidadosamente para evitar la formación de espuma y una vez disuelta totalmente la goma arábica, se enrasó con agua bidestilada hasta 100 ml.

La emulsión, como ya se ha dicho anteriormente, se preparó, en todos los casos, a partir de una mezcla compuesta por el sustrato, tampón y solución emulsificante. Dicha mezcla se preparó en un tubo de plástico de 5 ml de capacidad que poseía tampón. Sobre dicho tubo, previamente tarado, se puso en primer lugar el sustrato en la cantidad correspondiente para cada tipo de muestra según se indicó anteriormente. El volumen de sustrato correspondiente se pesó con objeto de conocer exactamente la cantidad puesta. Posteriormente, se añadieron los volúmenes correspondientes de tampón y de solución emulsificante dependiendo del tipo de muestra de que se trataba.

La emulsión de la mezcla se llevó a cabo mediante ultrasonidos, con la ayuda del sonicador referido anteriormente. El tubo que contenía la mezcla a emulsionar se introdujo dentro de un recipiente con hielo picado para evitar que la muestra se sobrecalentara durante el proceso de emulsificación. El tiempo de sonicación fue de 2 minutos dividido en dos periodos de 1 minuto cada uno. La intensidad en el sonicador se fijó de tal forma que la potencia de salida obtenida, que dependía de la muestra a sonicar, fue de 55 watios aproximadamente.

- **Medio de reacción:** disolución tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=8,3).

La mezcla de reacción consistió en 1 ml de disolución enzimática de lipasa pancreática porcina, y cantidades variables de los diferentes sustratos emulsionados (trioleína, 1,3 dioleína y TGOP, antes y después de su alteración), todo ello en medio Tris-HCl 0,01 M (pH= 8,3), siendo el volumen total de reacción de 10 ml. La temperatura de trabajo fue de 37°C y durante todo el proceso la agitación se mantuvo constante e igual a ≈ 1300 rpm.

Se realizaron diferentes ensayos en los que la concentración del sustrato en el reactor varió según lo indicado en la tabla 3.

La reacción se llevó a cabo añadiendo en el reactor termostatizado el medio de reacción y el sustrato emulsionado correspondiente, permaneciendo durante 10 minutos en preincubación para que la mezcla alcanzara la temperatura adecuada que fue de 37°C. Transcurrido ese tiempo se añadió la disolución enzimática. El tiempo de duración de cada ensayo fue de 10 minutos.

Tabla 3. Cantidades de sustrato utilizadas en los ensayos de actividad

Sustrato emulsionado (μ l)	Solución de lipasa pancreática (ml)	Tampón Tris-HCl 0,01 N pH=8,3(ml)
10	1	8,99
20	1	8,98
40	1	8,96
60	1	8,94
80	1	8,92
100	1	8,90
150	1	8,85

La concentración de iones H^+ , liberados como consecuencia de la hidrólisis de los diferentes sustratos utilizados, se valoró con $NaOH\ 5 \cdot 10^{-3}\ N$, previamente titulada con biftalato ácido de potasio como patrón.

Las diferentes experiencias se realizaron por triplicado o cuadruplicado hasta conseguir un error estándar inferior al 5% , expresándose los resultados como el valor medio de los mismos.

Mediante la técnica de valoración con pH-stato se adicionó automáticamente al medio de reacción, la cantidad de $NaOH$ necesaria para neutralizar los ácidos grasos producto de la lipólisis, y de esta forma se mantuvo el pH a un valor fijo.

El seguimiento de las reacciones de lipólisis se realizó registrando la adición de $NaOH$ valorante a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo el cálculo de la actividad de la lipasa pancreática se midió como velocidad, la velocidad inicial de reacción, con objeto de evitar la posible inhibición que pueda tener lugar debido a la aparición de lo productos de reacción.

De las pendientes de los tramos rectos de las curvas de $NaOH$ valorante añadida en función del tiempo, se obtuvieron mediante ajuste por mínimos cuadrados, los valores de las velocidades iniciales de reacción, que tras aplicar los correspondientes factores de

conversión, se expresaron en μmoles por minuto y por mg de preparación enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}$).

Posteriormente, se representaron las velocidades iniciales de reacción ($\mu\text{mol}/\text{min mgE}$) en función de la concentración de sustrato (mM). El ajuste de los puntos experimentales a una curva se realizó mediante regresión no lineal. Para discernir acerca de la bondad de dicho ajuste, se empleó el criterio de los mínimos cuadrados con pesos estadísticos, es decir una regresión en la que no se asumía que el error de la variable dependiente fuera constante.

Los ajustes no se realizaron con los valores medios de las réplicas sino con todos los valores individuales para que los test estadísticos utilizados tuvieran siempre los grados de libertad apropiados. Sin embargo, las gráficas de las figuras se hicieron con los valores medios y sus correspondientes barras de error para mejorar la claridad de presentación. Las barras de error se refieren a límites de confianza al 95%, calculados a partir de la respectiva desviación estándar y de la "t" de Student correspondiente.

III.3.2 ACEITES VEGETALES.

Se realizó el estudio cinético de la lipasa pancreática porcina sobre aceites vegetales de uso alimentario tales como **oleína de palma**, **aceite de girasol refinado** y **aceite de oliva virgen**. De igual forma, se estudió la actividad de dicha enzima digestiva frente a la oleína de palma y el aceite de girasol después de su utilización en frituras repetidas de patatas sin recambio con aceite nuevo.

III.3.2.1 Aceites vegetales, alteración mediante frituras y estudio de la degradación producida.

La oleína de palma (AGRA S.A., Bilbao) y el aceite de girasol refinado (Koipe; Andujar, Jaén) son los referidos en las secciones III.1 y III.2 de la presente Memoria. En los estudios de actividad lipásica además se usó aceite de oliva virgen (Carbonell, Córdoba).

III.3.2.1.1 CARACTERIZACION DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

El aceite de oliva virgen se analizó mediante diversas técnicas con objeto de establecer su composición y características físico-químicas. Los análisis realizados fueron los siguientes:

1.- Determinación del índice de refracción, según la técnica descrita en el apartado III.1.3.1.1.

2.- Determinación de la acidez libre, según la técnica que aparece descrita en el apartado III.1.3.1.2.

3.- Determinación de la composición en ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa. Dicho análisis se realizó de la forma descrita previamente en el apartado III.1.3.2.1.

4.- Evaluación de su contenido en compuestos polares mediante cromatografía en columna de gel de sílice según la técnica descrita en el apartado III.1.3.2.2.

5.- Caracterización y cuantificación de los compuestos que forman la fracción polar. Dicha determinación se realizó mediante la técnica de HPSEC según lo descrito en el apartado III.1.3.3.1.

III.3.2.1.2 OLEINA DE PALMA Y ACEITE DE GIRASOL REFINADO.

La composición y parámetros físicoquímicos del aceite de girasol refinado y oleína de palma antes y después de ser usados en la fritura de patatas, se encuentran descritos en las secciones III.1 y III.2 de la presente Memoria respectivamente.

III.3.2.2 Determinación de la actividad lipásica.

Se midió la actividad de la lipasa pancreática porcina utilizando como sustrato el aceite de girasol y la oleína de palma antes y después de su utilización en la fritura de patatas.

Se emplearon muestras de aceite de girasol sin alterar y procedentes de 30 y 60 frituras de patatas realizadas sin recambio de aceite. Con relación a la oleína de palma, se

usaron muestras sin alterar y procedentes de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 90 frituras de patatas, respectivamente, sin renovación de aceite.

Por otro lado, el aceite de oliva virgen también sirvió como sustrato para la lipasa pancreática porcina.

La determinación de la actividad lipásica frente a aceites vegetales se realizó, al igual que para las sustancias patrón, mediante el método potenciométrico de valoración a pH fijo referido en el apartado III.3.1.4. Las condiciones de ensayo fueron similares a las expuestas en dicho apartado, con la diferencias siguientes:

1.- El volumen total de mezcla con el que se realizaron las emulsiones de los diferentes aceites vegetales fue de 50 ml, frente a los 3 ml de la mezcla en el caso de las sustancias patrón. Esto se debió a la mayor disponibilidad de los aceites en relación a las sustancias puras debido fundamentalmente al elevado coste de estas últimas.

La composición de la mezcla a emulsionar en el caso de los aceites fue la misma para todos y estuvo formada por:

7,5 ml de aceite

7,5 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=8,3)

35 ml de solución emulsificante.

2.- La preparación de la emulsión se realizó de forma similar a las sustancias patrón, sin embargo en este caso, y, debido al diferente volumen de mezcla usado, se utilizaron recipientes de plástico de 60 ml de capacidad previamente tarados. El tiempo de sonicación de las muestras de aceite fue de 6 minutos dividido en dos series de 3 minutos cada una. La potencia de salida obtenida en todos los casos fue de 80 vatios aproximadamente.

III.4 LIPASA PANCREATICA *IN VITRO*. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA LIPOLISIS.

Se realizó un estudio de la capacidad hidrolítica de la lipasa pancreática porcina sobre diferentes sustratos con distinto grado de alteración. Dicha capacidad se estimó en función de las variaciones producidas en la composición de los sustratos antes y después de la lipolisis, con objeto de estudiar la influencia que pudiera tener la diferente alteración termooxidativa de los sustratos sobre los productos liberados.

Para la realización de dicho estudio se utilizaron muestras de oleína de palma sin usar y procedente de diferentes frituras de patatas, así como sus correspondientes fracciones de triglicéridos no alterados y de compuestos polares, lo que permitió estudiar sustratos con muy diferente grado de alteración.

Estos estudios se realizaron además sobre una sustancia pura como es la trioleína, que se utilizó como referencia.

III.4.1 SUSTRATOS EMPLEADOS.

Las muestras utilizadas como sustrato en dicho estudio fueron la oleína de palma sin usar y procedente de 40 y 90 frituras de patatas, así como sus respectivas fracciones de triglicéridos no alterados y de compuestos polares obtenidas mediante cromatografía en columna (apartado III.2.3.2.1) y cuya eficacia en la separación se comprobó mediante cromatografía en columna. En este estudio además se utilizó la trioleína (Sigma Chemical) como sustrato de referencia.

III.4.2 HIDROLISIS ENZIMATICA.

La hidrólisis enzimática de los diferentes sustratos se realizó mediante una modificación de la técnica que aparece en la Norma UNE 55-079-73 (1973).

Previamente a la realización de las determinaciones, se llevó a cabo la puesta a punto de la técnica, estableciendo las condiciones idóneas de trabajo mediante el control de parámetros como: tiempo de preincubación de la muestra, solubilización de la enzima en el tampón y tiempo de ensayo. De esta manera el tiempo de hidrólisis de 20 minutos nos pareció el más adecuado para nuestro estudio.

* Material y reactivos:

- Baño de agua termostatzado.
- Agitador electromagnético.
- Ampollas de decantación de 25 ml de capacidad.
- Tubos pirex de 10 ml de capacidad con tapón de rosca.
- Lipasa pancreática porcina (E C 3.1.1.3) tipo II (Sigma), tris- hidroximetil-amino- metano (Merck), CaCl_2 (Panreac), Colato sódico (Merck), HCl (Merck), eter etílico y hexano (Carlo Erba), sulfato sódico anhidro (Panreac) y THF grado HPLC (Carlo Erba).

* Disolución enzimática:

- Enzima: lipasa pancreática porcina. Se utilizó una disolución de dicha enzima en tampón Tris-HCl 1 M (pH=8). La concentración de la disolución enzimática fue de 10 mg de polvo de lipasa/ml de tampón. Previamente a su utilización, la disolución enzimática se agitó durante 2 horas a 4°C con el fin de conseguir una máxima homogeneización.

* Procedimiento operativo.

Se pesaron 100 mg de la muestra de grasa en un tubo de 10 ml de capacidad con tapón de rosca y junta de teflón, y posteriormente se añadieron 0,2 ml de una disolución de cloruro cálcico al 22% y 0,5 ml de una disolución de colato sódico al 0,1%. A continuación, se introdujo el tubo con la muestra en un baño termostatzado a 37°C y con agitación electromagnética donde se atemperó durante 10 minutos. Una vez finalizada la preincubación se añadieron 2 ml de la disolución enzimática descrita anteriormente, comenzando entonces la hidrólisis que se prolongó durante 20 minutos a 37°C y con agitación. Pasado ese tiempo, la hidrólisis se detuvo añadiendo 1 ml de ácido clorhídrico 6 N. Los productos de la hidrólisis se extrajeron cinco veces con 2 ml de eter etílico. Los extractos etéreos se lavaron

varias veces con 10 ml de agua bidestilada hasta que las aguas de lavado no dieron reacción ácida. La posible humedad existente en la fase etérea se eliminó con ayuda de sulfato sódico anhidro. A continuación se eliminó el disolvente introduciendo la muestra en el baño a 40°C y bajo corriente de nitrógeno.

La muestra hidrolizada se redisolvió en 5 ml de THF con calidad para HPLC y posteriormente dicha muestra se analizó mediante HPSEC con objeto de caracterizar y cuantificar los productos de la lipólisis.

III.4.3 ESTUDIO ESTADISTICO.

El desarrollo computacional de los resultados se realizó, con la ayuda de D^a Laura Barrios, Jefe del Dpto. de Estadística del Centro Técnico de Informática CTI-CSIC, en un VAX 9210-VMS del CTI-CSIC con el paquete de programas BMDP. Los test realizados fueron los siguientes:

i) Análisis de varianza (ANOVA).

Cuando los sustratos fueron las fracciones de triglicéridos no polares de la oleína de palma procedente de diferentes frituras y la trioleína, los resultados obtenidos se estudiaron mediante un ANOVA de una vía, ya que se relacionó únicamente la composición de dichos sustratos después de la hidrólisis enzimática.

Sin embargo, los resultados de las hidrólisis de la oleína de palma utilizada en diferentes frituras de patatas y/o de sus fracciones polares correspondientes, se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, ya que, por un lado, se estudió la influencia de la fritura y, por otro, la de la hidrólisis sobre la composición de las diferentes muestras. Cuando se observó interacción entre ambos factores, se analizó por separado el efecto de cada uno de ellos mediante el uso de un test-T de pares.

ii) Se realizó, además, un análisis factorial de la totalidad de los valores de composición de las diferentes muestras analizadas. Dicho análisis factorial es similar al descrito en el apartado III.2.4.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 FRITURA DE PATATAS EN ACEITE DE GIRASOL. ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA EN DICHO ACEITE UTILIZANDO DOS MODALIDADES DIFERENTES DE FRITURA.

Se estudió la alteración producida en un aceite de girasol refinado como consecuencia de su utilización en fritura de patatas de forma repetida y discontinua con y sin renovación del aceite del baño de la freidora.

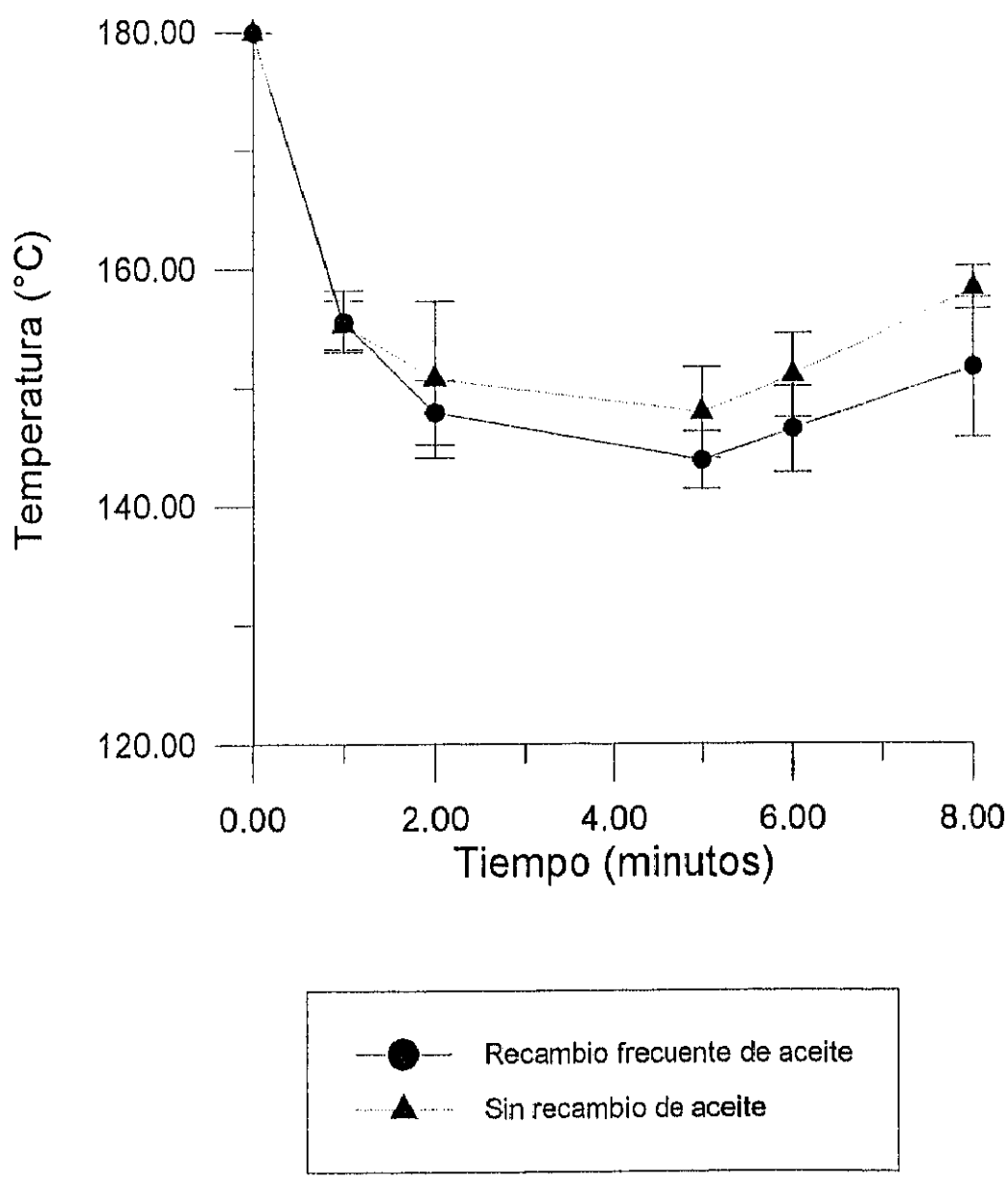
IV.1.1 VARIACION DE LA TEMPERATURA DEL ACEITE DURANTE EL PROCESO DE FRITURA.

En las tablas 4 y 5 se muestran los valores de la temperatura del aceite del baño de la freidora en el primer, segundo, quinto, sexto y octavo minuto de fritura en las dos modalidades empleadas, con adición frecuente de aceite sin usar (tabla 4) y sin renovación del aceite (tabla 5). En dichas tablas (4 y 5), se puede observar como no se produjeron diferencias significativas en la temperatura del aceite de la freidora entre las diferentes frituras realizadas con y sin renovación de aceite.

En la figura 47 se representa conjuntamente la evolución de la temperatura del aceite de girasol del baño de fritura durante ambos estudios (con y sin renovación de aceite). En dicha figura aparecen los valores de las temperaturas promedio obtenidas a partir de todas las frituras realizadas según la modalidad correspondiente.

Como se puede observar en la figura 47, en ambos casos, la temperatura del aceite del baño de fritura que inicialmente era de 180°C, sufrió un profundo descenso como consecuencia de la adición del alimento, estabilizándose entre el segundo y quinto minuto de fritura, para después elevarse de nuevo paulatinamente. La variación de la temperatura del aceite durante la fritura es debida a los procesos de evaporación de agua y absorción de grasa que tienen lugar cuando se añade el alimento al aceite caliente, que fueron comentados en el apartado I.1 de la Introducción.

Figura 47.- Comparación entre la evolución de la temperatura del aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas con y sin recambio de aceite.



Esta evolución de la temperatura es semejante a la obtenida por otros autores como Garrido-Polonio y col. (1994), Hernández y col. (1989) y Sánchez-Muniz y col. (1995) friendo patatas en aceite de girasol y oliva respectivamente.

Tabla 4. Evolución de la **temperatura** del aceite de girasol del baño de fritura durante 75 frituras sucesivas de patatas **con recambio frecuente de aceite**.

Nº de fritura	Temperatura*				
	1 ^{er} minuto	2º minuto	5º minuto	6º minuto	8º minuto
1	156,0 ± 4,00 ^a	147,0 ± 5,00 ^a	144,5 ± 2,50 ^a	145,5 ± 1,50 ^a	145,0 ± 1,00 ^a
20	153,5 ± 6,00 ^a	144,0 ± 0,00 ^a	140,5 ± 0,50 ^a	142,5 ± 1,50 ^a	147,5 ± 4,50 ^a
30	159,5 ± 0,50 ^a	150,0 ± 1,00 ^a	145,5 ± 3,50 ^a	150,5 ± 5,50 ^a	154,5 ± 5,50 ^a
50	156,0 ± 0,00 ^a	151,0 ± 0,50 ^a	147,0 ± 7,00 ^a	150,0 ± 6,00 ^a	160,0 ± 4,00 ^a
75	153,0 ± 5,00 ^a	147,5 ± 2,50 ^a	142,0 ± 2,00 ^a	144,0 ± 2,00 ^a	151,0 ± 1,00 ^a

* Los valores representan la **media ± la desviación estándar** de 2 determinaciones. No se encontraron diferencias significativas para valores dentro de la misma columna según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones.

Cuando se compara el valor medio de la temperatura del aceite de las freidoras en ambas modalidades de fritura utilizadas (figura 47), puede observarse que, tanto en un caso como en otro, la evolución de la temperatura del aceite respondió a un patrón similar. Sin embargo, mientras que en el primer minuto de fritura la temperatura media fue similar en ambos estudios (155,6 ± 2,6 *versus* 155,3 ± 2,1 °C), a partir del segundo minuto los valores más altos de temperatura del aceite de la freidora se alcanzaron cuando las diferentes frituras se realizaron sin recambio de aceite (147,9 ± 2,7 *versus* 150,7 ± 6,6 °C; 143,9 ± 2,4

versus $147,9 \pm 3,8^{\circ}\text{C}$; $146,5 \pm 3,6$ versus $151,1 \pm 3,6^{\circ}\text{C}$; $151,6 \pm 5,9$ versus $158,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ para los minutos segundo, quinto, sexto y octavo de fritura con y sin reposición de aceite respectivamente).

Tabla 5. Evolución de la **temperatura** del aceite de girasol del baño de fritura durante 60 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite**.

Nº de fritura	N	Temperatura*				
		1 ^{er} minuto	2 ^o minuto	5 ^o minuto	6 ^o minuto	8 ^o minuto
1	7	$158,7 \pm 5,82^a$	$153,6 \pm 4,89^a$	$153,3 \pm 5,96^a$	$153,4 \pm 4,08^a$	$159,9 \pm 9,06^a$
10	7	$155,4 \pm 9,22^a$	$147,4 \pm 9,62^a$	$146,1 \pm 6,74^a$	$149,6 \pm 7,72^a$	$155,7 \pm 6,97^a$
30	5	$154,2 \pm 6,80^a$	$146,4 \pm 4,10^a$	$147,6 \pm 3,85^a$	$151,6 \pm 5,41^a$	$157,6 \pm 8,41^a$
50	3	$155,0 \pm 5,00^a$	$145,3 \pm 6,11^a$	$143,0 \pm 1,73^a$	$145,7 \pm 1,53^a$	$158,3 \pm 2,89^a$
60	2	$153,0 \pm 4,24^a$	$161,0 \pm 1,41^a$	$149,5 \pm 2,12^a$	$155,0 \pm 4,24^a$	$160,0 \pm 0,00^a$

N: Número de determinaciones. * Los valores representan la media \pm la desviación estándar del número de determinaciones. No se encontraron diferencias significativas para valores dentro de la misma columna según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones.

El control de la temperatura del aceite del baño durante la fritura es muy importante ya que la velocidad de degradación de los aceites durante dicho procedimiento culinario es proporcional a la temperatura a la que se realiza el proceso (Gere, 1983a; Fedeli, 1988; Lomanno y Nawar, 1982; Perkins y Akkeren, 1965).

IV.1.2 RENDIMIENTO.

El rendimiento del aceite empleado en las frituras se evaluó en relación a dos variables:

- i) pérdida de aceite del baño de fritura.
- ii) peso del alimento frito en relación con su peso en crudo.

IV.1.2.1 Pérdida de volumen de aceite del baño de fritura.

Durante la fritura se producen pérdidas de volumen de grasa culinaria debidas a la absorción de grasa por los alimentos.

En las tablas 6 y 7 aparecen representadas las pérdidas de volumen de aceite producidas durante los dos estudios realizados -con adición (tabla 6) y sin adición de aceite sin usar (tabla 7)-. En dichas tablas aparece expresada la pérdida de volumen de aceite como ml de aceite perdido por freidora y fritura, y como % de pérdida respecto al volumen total de la freidora en cada fritura.

Dichos volúmenes de aceite perdido fueron los que se adicionaron posteriormente de aceite fresco a fin de mantener constante la relación grasa culinaria/alimento a freir en 500 g/3 l a lo largo del estudio.

Cuando las frituras de patatas se realizaron con recambio frecuente del aceite de la freidora (tabla 6), se encontró que el porcentaje medio de pérdida de aceite cada fritura fue del $\approx 1,9\%$, por lo que se puede estimar que, durante las 75 frituras de patatas, el volumen total de aceite fresco añadido fue de 4,5 litros aproximadamente.

Comparando las pérdidas de aceite producidas, se encontró una tendencia a incrementarse dichas pérdidas con el número de frituras, hasta la fritura 40, disminuyendo posteriormente.

Tabla 6. Rendimiento del volumen por freidora del aceite de girasol empleado en 75 frituras repetidas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Número de fritura	N	Pérdida de volumen de aceite*	
		ml/freidora y fritura	% de pérdida/fritura
0-10	4	38,8 ± 7,60 ^a	1,29
11-20	6	48,0 ± 5,35 ^a	1,60
21-30	4	75,0 ± 5,78 ^b	2,50
31-40	4	75,0 ± 5,78 ^b	2,50
41-50	4	56,5 ± 4,36 ^{ab}	1,88
51-60	4	57,5 ± 2,89 ^{ab}	1,92
61-70	4	55,0 ± 3,34 ^{ab}	1,83
71-75	2	50,0 ± 14,1 ^{ab}	1,67

* Los valores representan la media ± la desviación estándar del número de determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Cuando se estudiaron las pérdidas de volumen de aceite producidas durante la fritura de patatas sin renovación de aceite (tabla 7), el volumen de aceite perdido en las freidoras como consecuencia de la absorción de grasa por las patatas se incrementó a medida que aumentó el número de frituras realizadas, pasándose de un porcentaje de pérdida del 9,38% durante las diez primeras frituras a una pérdida del 19,7% del volumen total de la freidora entre las frituras 51 y 60.

Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por Guillaumin (1973), quien registró un aumento en casi el doble en la cantidad de grasa absorbida por las patatas cuando

se realizaron un mayor número de frituras. También Garrido-Polonio y col. (1994) y Sánchez-Muniz y col. (1993a) encuentran un incremento de las pérdidas de aceite con el número de frituras realizando frituras de patatas sin renovación de aceite.

Tabla 7. Rendimiento del volumen por freidora del aceite de girasol empleado en 60 frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite.

Número de fritura	N	Pérdida de volumen de aceite*	
		ml/freidora y fritura	% de pérdida/fritura
0-10	7	28,13 \pm 6,62 ^a	0,94
11-20	6	37,40 \pm 8,00 ^a	1,25
21-30	5	41,67 \pm 7,64 ^a	1,39
31-40	4	46,67 \pm 5,77 ^a	1,56
41-50	3	52,50 \pm 3,54 ^b	1,75
51-60	2	59,05 \pm 4,53 ^b	1,97

* Los valores representan la media \pm la desviación estándar del número de determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

La explicación de este hecho, según Morton y Alim (1974) es que en los aceites, como consecuencia de su utilización en frituras de alimentos, se produce un aumento de su viscosidad por la aparición de productos de alteración termooxidativa. Teniendo en cuenta que la viscosidad de una grasa determina la cantidad de ésta que cubre al alimento frito y deja el medio de fritura, al incrementarse dicha propiedad en los aceites, más cantidad de éstos se queda en la superficie del alimento.

Blumenthal (1991) postula que a medida que un aceite se va alterando, se produce un aumento del tiempo de contacto entre éste y el alimento debido a la aparición de sustancias con carácter humectante en el aceite que actúan disminuyendo la tensión interfacial entre el aceite y el alimento. Este hecho hace que el alimento absorba aceite en exceso y que aumente la tasa de transferencia de calor a la superficie del alimento.

IV.1.2.2 Variación del peso de las patatas.

En las tablas 8 y 9 aparecen los valores de los pesos de las patatas una vez fritas tanto con renovación (tabla 8) como sin renovación de aceite (tabla 9).

Teniendo en cuenta que en cada tanda se frieron 500 g de patatas, los datos señalan una pérdida del 60% de su peso en el caso de la fritura de patatas con renovación frecuente de aceite y del 55% cuando no se produjo recambio de aceite. Dichas pérdidas de peso se debieron principalmente a la deshidratación de las patatas producida durante la fritura como señalan Varela (1988) y Garrido-Polonio y col. (1994).

Cuando se frieron patatas con recambio frecuente de aceite (tabla 8), no se encontraron diferencias en el peso de las patatas procedentes de las diferentes frituras realizadas.

Sin embargo, cuando las frituras se realizaron sin renovación de aceite (tabla 9), el peso de las patatas fritas fue mayor a medida que aumentó el número de frituras, siendo este aumento significativo después de la fritura 50. Estos datos son similares a los encontrados por Figueroa (1984), Hernández (1989) y Garrido-Polonio (1991), friendo patatas en diferentes grasas culinarias, en las que el peso de las mismas tendió a incrementarse al aumentar el número de frituras.

En resumen, cuando se realizaron frituras sucesivas y discontinuas de patatas en aceite de girasol sin renovación de aceite se produjo, según lo esperado, una mayor pérdida de aceite del baño de la freidora y un aumento del peso de las patatas fritas, conforme aumentó el número de frituras. Resultados análogos han sido descritos por Garrido-Polonio y col. (1994) friendo patatas en aceite de girasol sin recambio de aceite sin usar.

Tabla 8. Fritura de patatas en aceite de girasol **con recambio frecuente de aceite.**
Peso de las patatas fritas después de cada serie de frituras.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Peso de patatas (g)
0-10	20	194,8 ± 5,41 ^a
11-20	20	204,5 ± 3,90 ^a
21-30	20	194,8 ± 2,80 ^a
31-40	20	187,5 ± 4,74 ^a
41-50	20	210,0 ± 5,14 ^a
51-60	20	200,5 ± 3,74 ^a
61-70	20	198,7 ± 2,29 ^a
71-75	10	195,0 ± 8,75 ^a

Los valores representan la media \pm la desviación estándar del número de determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Sin embargo, cuando las frituras se realizaron con recambio frecuente de aceite, al aumentar el número de frituras no se encontraron diferencias en la pérdida de volumen de aceite de la freidora, ni en el peso de las patatas fritas. Esto puede deberse a que la adición de aceite nuevo en la freidora produciría una dilución de los productos de la alteración, no observándose por ello una tendencia clara en el peso de las patatas fritas y el volumen de aceite perdido.

Tabla 9. Fritura de patatas en aceite de girasol sin recambio de aceite. Peso de las patatas fritas después de cada serie de frituras.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Peso de patatas (g)
0-10	70	205,7 \pm 16,9 ^a
11-20	60	227,5 \pm 15,1 ^a
21-30	50	212,0 \pm 11,5 ^a
31-40	40	221,3 \pm 37,1 ^a
41-50	30	223,3 \pm 20,8 ^a
51-60	20	257,5 \pm 10,6 ^b

Los valores representan la media \pm la desviación estándar del número de determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

IV.1.3 INDICES ANALITICOS DE CARACTER GENERAL.

El calentamiento prolongado de aceites vegetales que tiene lugar durante la fritura de los alimentos, es un proceso relativamente energético que altera las características físico-químicas de los mismos. En este apartado se presentarán y discutirán los resultados obtenidos al utilizar diferentes índices analíticos para evaluar los cambios producidos en el aceite de girasol como consecuencia de su uso en frituras repetidas de patatas.

IV.1.3.1 Índice de refracción.

En las tablas 10 y 11 aparecen los valores del índice de refracción del aceite de girasol de partida, así como el de dicho aceite después de ser usado en frituras sucesivas de patatas con y sin renovación de aceite. De igual forma, en la figura 48 se representan los valores del índice de refracción de dicho aceite después de emplearse para freír patatas utilizando las dos modalidades de fritura ya mencionadas.

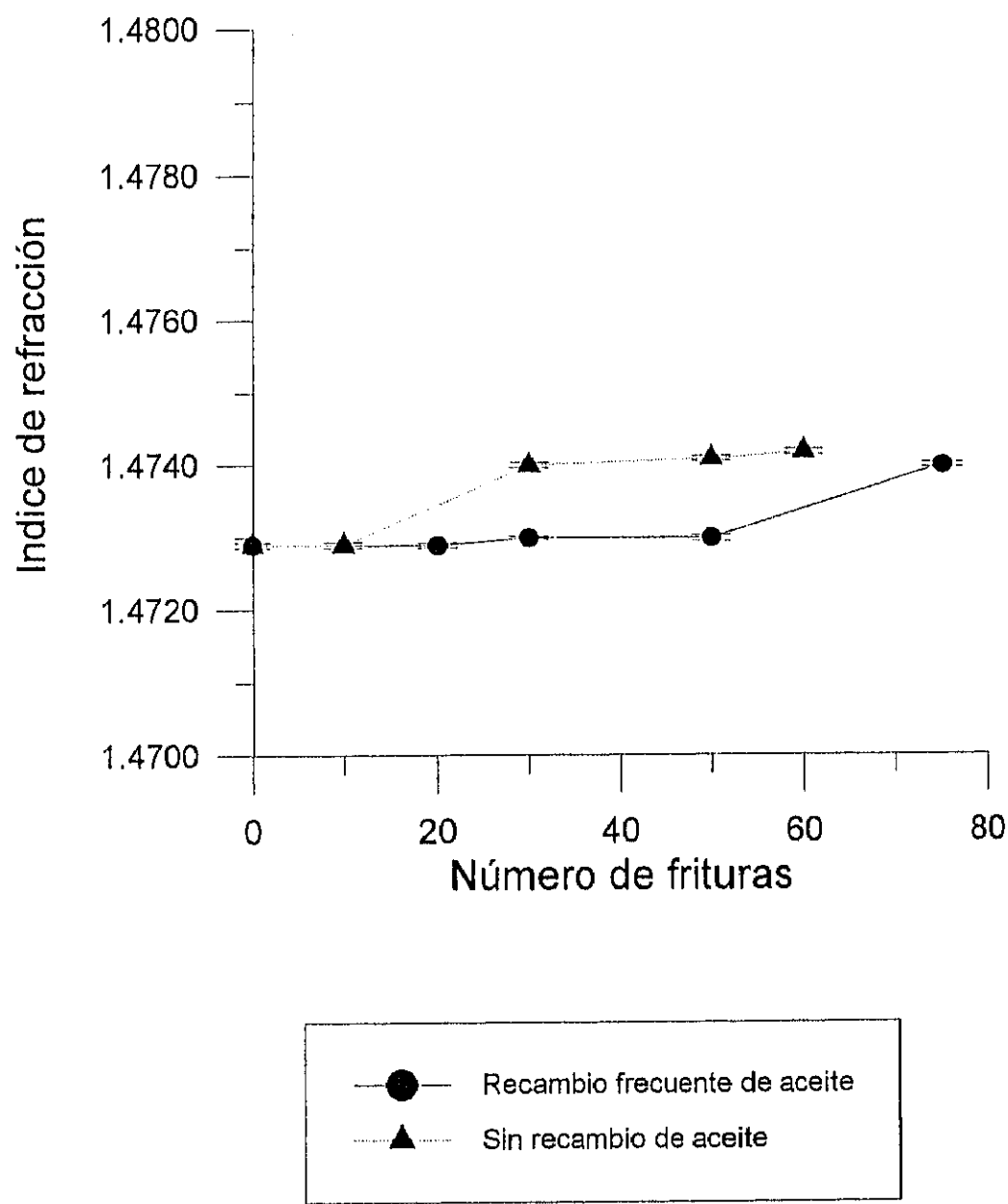
Tabla 10. Evolución del índice de refracción de un aceite de girasol utilizado en 75 frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Índice de refracción a 20°C
0	3	$1,4729 \pm 3,55 \times 10^{-5}^a$
20	3	$1,4729 \pm 3,55 \times 10^{-5}^a$
30	3	$1,4730 \pm 1,99 \times 10^{-5}^a$
50	3	$1,4730 \pm 4,03 \times 10^{-5}^a$
75	3	$1,4740 \pm 3,55 \times 10^{-5}^a$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de tres determinaciones. No se encontraron diferencias significativas según el test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones.

Todos estos valores están dentro de lo establecido por la Norma UNE 55-095-73 (1973), y el B.O.E. (Presidencia del Gobierno, 1983) como valores normales para un aceite de girasol.

Figura 48.- Comparación entre el índice de refracción del aceite de girasol usado en frituras repetidas de patatas con y sin recambio de aceite.



Cuando la fritura de patatas se llevó a cabo con recambio frecuente de aceite (tabla 10), el índice de refracción aumentó a partir de la fritura vigésima en la cuarta cifra decimal, si bien este aumento no fue significativo. Los valores pasaron desde 1,4729 en el aceite basal, hasta 1,4740 en el aceite utilizado en 75 frituras de patatas.

Cuando se realizaron frituras de patatas sin renovación de aceite (tabla 11), el índice de refracción, como en el caso anterior, aumentó muy ligeramente, pero de forma significativa a partir de la décima fritura, pasando de un valor de 1,4729 en el aceite sin usar a 1,4742 después de realizar 60 frituras de patatas.

Tabla 11. Evolución del índice de refracción de un aceite de girasol utilizado en 60 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Índice de refracción a 20°C
0	3	1,4729 \pm 3,55 x 10 ⁻⁵ ^a
10	3	1,4729 \pm 3,96 x 10 ⁻⁵ ^a
30	3	1,4740 \pm 3,50 x 10 ⁻⁵ ^b
50	3	1,4741 \pm 4,20 x 10 ⁻⁵ ^b
60	3	1,4742 \pm 4,00 x 10 ⁻⁵ ^b

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

De hecho, cuando se relacionaron los valores del índice de refracción con su fritura correspondiente se encontró una correlación positiva y significativa ($r = 0,9476$; $p < 0,01$).

Sin embargo, Sánchez-Muniz y col. (1994), utilizando un diseño experimental equivalente al del presente estudio, no encontraron correlaciones significativas entre el índice de refracción y el número de frituras después de freir patatas en aceite de girasol durante 15 veces consecutivas.

Las variaciones de este índice en los aceites utilizados en fritura se producen como consecuencia de la formación de polímeros en los aceites como ha sido descrito por diferentes autores (Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Permanyer y Boatella, 1977).

Varela y col. (1983) indican que, en general, el índice de refracción no se modifica cuando las condiciones son suaves.

Coll Hellín y Rueda Clausell (1984) encontraron muy pequeñas modificaciones en este índice en aceites de girasol, oliva y soja, durante veinticinco frituras de patatas a 170°C, resultados que concuerdan con los del presente estudio.

Cuesta y col. (1991b) registraron modificaciones únicamente en la cuarta cifra decimal de dicho índice en un aceite de oliva utilizado en quince frituras de patatas.

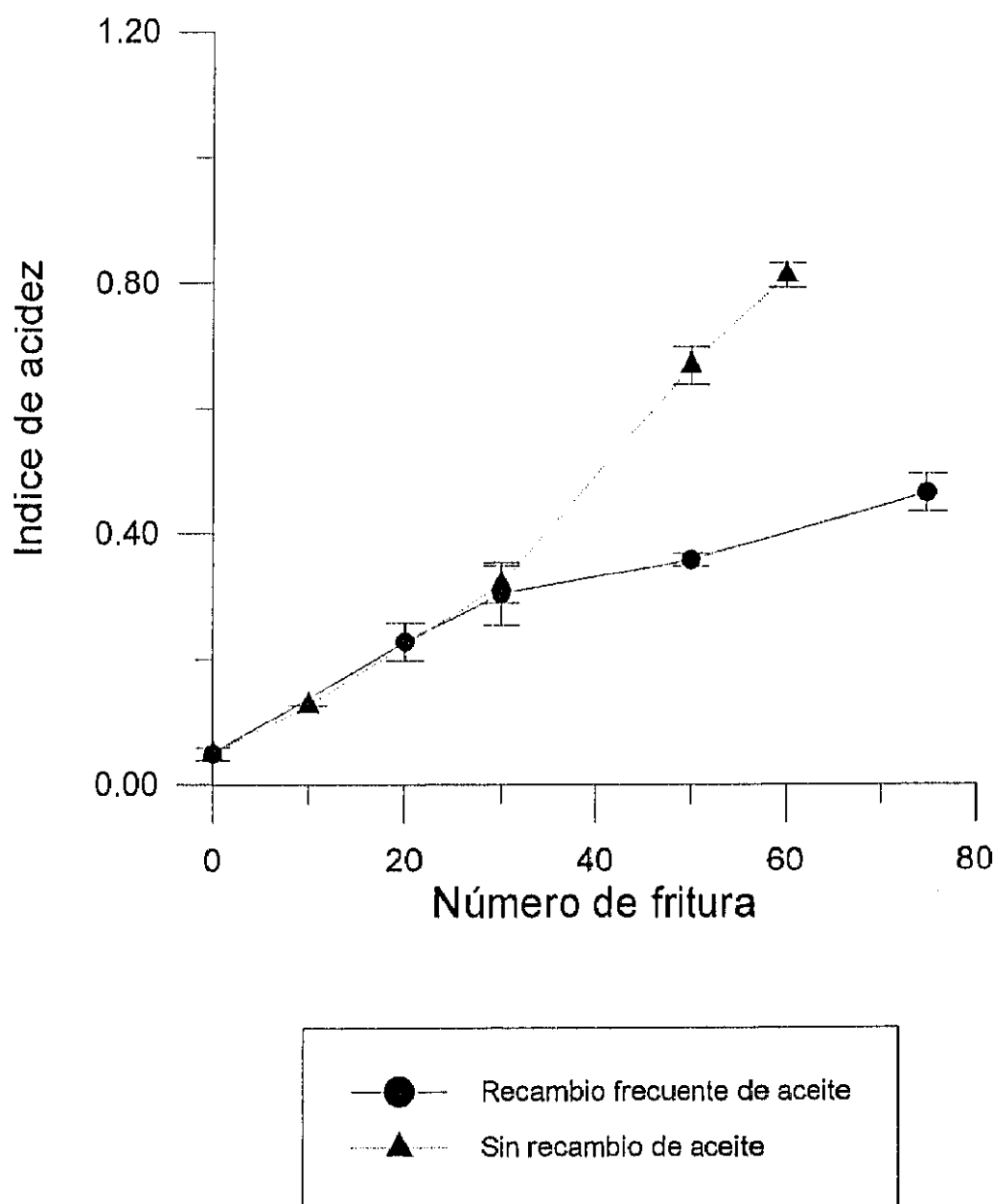
Díaz Alonso (1977) y Rodríguez y col. (1984) en condiciones más drásticas de fritura de patatas que las de estos estudios, encontraron un incremento de casi una milésima en dicho índice.

IV.1.3.2 Índice de acidez.

En las tablas 12 y 13 y la figura 49 se muestran los valores del índice de acidez del aceite de girasol sin usar y después de ser utilizado en sucesivas frituras de patatas con y sin renovación del aceite de la freidora. Según la Norma UNE 55-095-73 (1973) y el B.O.E. (Presidencia del Gobierno, 1983), se considera que en un aceite de girasol refinado para consumo alimenticio dicho índice debe ser menor de 0,2 (expresado en % de ácido oleico).

Como se puede observar en las tablas 12 y 13, en ambas modalidades de fritura, el índice de acidez se incrementó significativamente al aumentar el número de veces que el aceite se empleó para freir. Este aumento que, hasta la fritura 30 se produjo de forma paralela en ambos estudios, después de dicha fritura se intensificó más cuando las frituras se realizaron sin renovación del aceite. De esta forma, se pasó desde un valor de índice de

Figura 49.- Comparación entre el índice de acidez del aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas con y sin recambio de aceite.



acidez de $0,05 \pm 0,01$ (0,02% de ácido oleico) en el aceite de girasol de partida, a $0,46 \pm 0,03$ (0,23% de ácido oleico) después de la realización de 75 frituras de patatas con recambio frecuente de aceite y a $0,81 \pm 0,02$ (0,41% de ácido oleico) después de 60 frituras de patatas sin renovación de aceite.

Permanyer y col. (1985) y Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes (1988) indican que las variaciones del índice de acidez se producen como consecuencia de las alteraciones hidrolíticas que sufren los aceites durante la fritura.

La correlación encontrada entre el índice de acidez y el número de fritura fue muy elevada y significativa para el sistema de fritura sin renovación de aceite ($r = 0,9357$; $p < 0.01$).

Tabla 12. Evolución del **grado** y del **índice de acidez** de un aceite de girasol utilizado en 75 frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite sin usar.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Grado de acidez (% de ácido oleico)	Índice de acidez
0	3	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^a$
20	3	$0,11 \pm 0,03^b$	$0,23 \pm 0,03^b$
30	3	$0,15 \pm 0,05^c$	$0,30 \pm 0,05^c$
50	3	$0,18 \pm 0,01^d$	$0,36 \pm 0,01^d$
75	3	$0,23 \pm 0,03^e$	$0,46 \pm 0,03^e$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Según Al-Kahtani (1991), los ácidos grasos libres se forman por la hidrólisis de los triglicéridos que tiene lugar durante la fritura, debido a la presencia de agua procedente de

los alimentos y por oxidación, o por la reacción del aceite con agua formado durante otras reacciones de alteración. Para este autor, la medida de la acidez libre no puede determinar la idoneidad de los aceites de fritura para seguir siendo usados.

Fritsch (1981) opina que la determinación de la acidez libre no diferencia entre los ácidos formados por oxidación y los formados por hidrólisis. Según este autor, el incremento en el contenido de ácidos grasos no sería una buena medida de la degradación de los aceites producida por la fritura. Opiniones similares han sido manifestadas por autores tales como Castellón Arnau (1989) y White (1991).

Tabla 13. Evolución del **grado** y del **índice de acidez** de un aceite de girasol utilizado en 60 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite**.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Grado de acidez (% de ácido oleico)	Índice de acidez
0	3	0,02 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
10	3	0,06 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^b
30	3	0,16 ± 0,03 ^c	0,32 ± 0,03 ^c
50	3	0,34 ± 0,03 ^d	0,67 ± 0,03 ^d
60	3	0,41 ± 0,02 ^e	0,81 ± 0,02 ^e

Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

A pesar de esto, Sánchez-Muniz y col. (1994) realizando frituras de patatas en aceite de girasol, obtuvieron una correlación muy buena entre el índice de acidez y el grado de alteración de las diferentes muestras analizadas.

IV.1.4. METODOS ANALITICOS PARA LA EVALUACION DE LA ALTERACION TOTAL.

IV.1.4.1 Determinación de la composición porcentual en ácidos grasos.

En las tablas 14 y 15 se muestra la composición porcentual en ácidos grasos del aceite de girasol sin usar y después de ser utilizado en diferentes frituras de patatas utilizando las dos modalidades de dicho procedimiento culinario descritas (con y sin renovación de aceite).

Tabla 14. Evolución de la composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios de un aceite de girasol a lo largo de 75 frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Nº de fritura	Ácidos grasos mayoritarios*			
	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)
0	6,76±0,02 ^a	3,71±0,07 ^a	32,52±0,04 ^a	55,55±0,09 ^a
20	6,60±0,33 ^a	3,93±0,24 ^a	40,66±2,17 ^b	47,46±1,16 ^b
30	6,50±0,02 ^a	4,12±0,07 ^b	39,79±0,28 ^b	44,10±0,02 ^c
50	6,59±0,13 ^a	4,17±0,10 ^b	43,39±0,38 ^b	44,20±0,23 ^c
75	6,59±0,01 ^a	4,18±0,01 ^b	43,85±0,20 ^b	43,20±0,23 ^c

* Los valores están expresados en mg/100 mg de ácidos grasos totales y representan la media ± la desviación estándar de 2 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

La composición en ácidos grasos existente en el aceite de girasol de partida está dentro de los valores normales de una aceite de girasol refinado de buena calidad para consumo alimenticio (Norma UNE 55-095-73) y es del orden a la descrita por diferentes autores (Coll Hellin y Rueda Clausell, 1984; Garrido-Polonio y col. 1994).

Tabla 15. Evolución de la composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios de un aceite de girasol a lo largo de 60 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Ácidos grasos mayoritarios*			
	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)
0	6,76±0,02 ^a	3,71±0,07 ^a	32,52±0,04 ^a	55,55±0,09 ^a
10	6,66±0,05 ^a	3,85±0,13 ^a	32,47±0,09 ^a	55,38±0,11 ^b
30	6,49±0,06 ^b	3,94±0,27 ^a	39,31±0,27 ^b	48,16±0,16 ^c
50	6,21±0,02 ^c	4,19±0,02 ^b	43,16±0,15 ^c	44,67±0,00 ^d
60	6,79±0,16 ^a	4,18±0,03 ^b	42,96±0,18 ^c	44,10±0,06 ^d

* Los valores están expresados en mg/100 mg de ácidos grasos totales y representan la media ± la desviación estándar de 2 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; análisis de varianza de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

A la vista de los resultados obtenidos en ambos estudios (tablas 14 y 15), se puede afirmar que en ambas modalidades de fritura (con y sin recambio de aceite), el perfil de ácidos grasos del aceite de girasol se modificó de la misma forma en uno y otro caso al aumentar el número de frituras.

De esta forma, en ambos casos, se produjo un descenso significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de ácido linoleico (C18:2) que pasó de $55,6 \pm 0,1\%$ en el aceite de partida, a

43,2 \pm 0,2% y 44,1 \pm 0,1% (sobre el total de ácidos grasos de la muestra) después de 75 frituras con recambio de aceite y 60 frituras sin recambio, respectivamente. El descenso producido en ambos casos fue de alrededor del 20% entre la muestra de partida y la más alterada.

Como consecuencia de la desaparición del ácido linoleico en las muestras de aceite, se produjo un aumento en la proporción de los ácidos esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), mientras que el porcentaje de ácido palmítico (C16:0) permaneció constante en ambos estudios a pesar de las frituras.

La desaparición del ácido linoleico se pone de manifiesto también cuando se establecieron cocientes entre los porcentajes de los diferentes ácidos grasos respecto al ácido palmítico. Dichos cocientes aparecen en las tablas 16 y 17 correspondiendo a frituras en aceite de girasol con y sin recambio de aceite respectivamente.

Tabla 16. Cocientes establecidos entre el porcentaje de los ácidos grasos esteárico, oleico y linoleico respecto al del ácido palmítico en el aceite de girasol utilizado en frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Nº de fritura	C18:0/C16:0	C18:1/C16:0	C18:2/C16:0
0	0,56	4,80	8,21
20	0,60	6,16	7,19
30	0,63	6,12	6,78
50	0,63	6,58	6,71
75	0,63	6,65	6,56

Gere (1982) señaló que la estabilidad térmica de las materias grasas viene determinada por su grado de insaturación y los aceites con alto contenido en ácidos grasos insaturados son los más susceptibles a degradarse por el calor. Stevenson y col. (1984) indican que la

degradación oxidativa de las grasas está relacionada, de igual forma, con su grado de insaturación.

Tabla 17. Cocientes establecidos entre el porcentaje de los ácidos grasos esteárico, oleico y linoleico respecto al del ácido palmítico en el aceite de girasol utilizado en frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite.**

Nº de fritura	C18:0/C16:0	C18:1/C16:0	C18:2/C16:0
0	0,55	4,81	8,22
10	0,58	4,88	8,32
30	0,61	6,06	7,42
50	0,67	6,95	7,19
60	0,62	6,33	6,49

Según lo descrito en la bibliografía, en general se puede decir que, debido al proceso de fritura se produce un descenso significativo del porcentaje de ácido linoleico independientemente del tipo de grasa culinaria que se trate. Sánchez-Muniz y col. (1989 y 1995) defienden que las modificaciones producidas en la composición en ácidos grasos en los aceites sometidos al proceso de fritura de patatas, no sólo dependen del proceso termooxidativo, sino también de la penetración selectiva de los diferentes ácidos grasos dentro de dicho alimento.

Cuesta y col. (1991b) friendo patatas en aceite de oliva señalaron un incremento del porcentaje de ácidos grasos saturados en relación a los insaturados. Resultados análogos han sido descritos por algunos autores (Figueroa, 1984; Hernández, 1989; Miller y White, 1988; Thompson y Aust, 1983) en diferentes aceites después de su fritura o calentamiento.

Garrido-Polonio (1991) utilizando aceite de girasol en frituras repetidas de patatas no encontró variaciones del ácido oleico ni de los ácidos grasos saturados, sin embargo registró una disminución significativa del ácido linoleico.

Arroyo (1991) al estudiar la composición porcentual del aceite extraído de patatas fritas en girasol, describió un descenso en el porcentaje del ácido linoleico desde las primeras frituras, lo que repercutió en el porcentaje del resto de ácidos grasos, produciéndose incrementos significativos en el ácido esteárico y oleico fundamentalmente.

En conjunto, si se compara la variación de la composición porcentual de los diferentes ácidos grasos en aceite de girasol utilizado para freír patatas con y sin recambio de aceite, no parece haber diferencias entre los resultados obtenidos en ambas modalidades de fritura.

IV.1.4.2 Determinación cuantitativa de los triglicéridos no polares y de los compuestos polares del aceite.

Esta técnica, como ya se explicó en el apartado III.1.3.2.2 de Materiales y Métodos, es la recomendada por la IUPAC (1987b) y diversas legislaciones (Firestone y col. 1991) entre ellas la española (Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989), para la evaluación de la alteración producida en las grasas como consecuencia de la fritura de los alimentos.

Dicha técnica permite separar, mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, los triglicéridos no alterados del resto de los compuestos existentes en el aceite cuya polaridad es mayor, por lo que se denominan compuestos polares.

Según la legislación española (Dobarganes y col., 1989), un aceite utilizado en frituras debe ser descartado para el consumo cuando su contenido en compuestos polares es superior al 25%.

Para algunos investigadores (Castellón Arnau, 1989; Fritsch, 1981; Kyoko-Hara y Denshiro, 1989; Paradis y Nawar, 1981), la determinación del contenido en compuestos polares es un parámetro que define muy bien la alteración producida en las grasas durante la fritura.

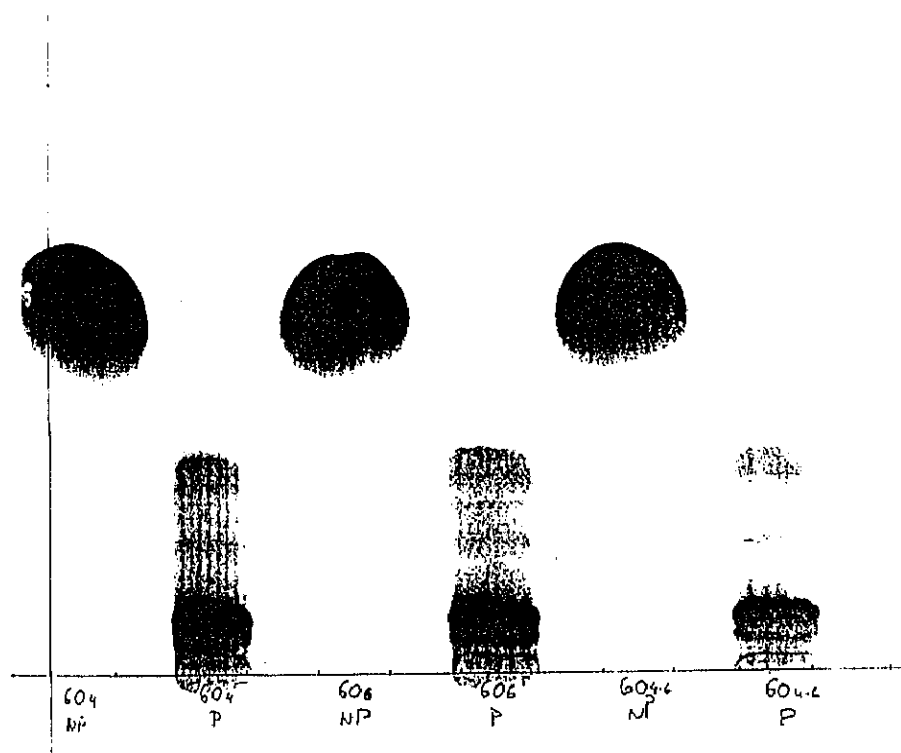
En las tablas 18 y 19 aparecen los resultados de dicha separación cromatográfica del aceite de girasol de partida y de las diferentes muestras de aceite procedentes de frituras de patatas con y sin recambio de aceite.

En dichas tablas aparecen diferentes datos que corresponden a triglicéridos no polares, fracción polar eluida, fracción polar retenida y fracción polar total. Con el término fracción

polar retenida, se denomina a la cantidad de compuestos que, debido a su elevada polaridad, no son eluidos y permanecen en la columna. La fracción polar total, por ello, es la suma de la fracción polar más la fracción retenida en columna. Debido a la poca magnitud de la fracción polar retenida en columna, cuando hablemos de compuestos polares nos referiremos al componente polar total.

Una vez separadas las distintas fracciones mediante cromatografía en columna, la eficacia de la separación se comprobó mediante cromatografía en capa fina como se indicó en Materiales y Métodos (apartado III.1.3.2.2). En la figura 50 aparece una placa de cromatografía donde se puede comprobar que aparecen manchas diferentes correspondientes a las fracciones de triglicéridos no polares y a los compuestos polares, no existiendo contaminación entre dichas fracciones. Se puede observar asimismo que existe una pequeña mancha superior dentro de la fracción de triglicéridos no polares que corresponde a parte de los componentes minoritarios del aceite (esteroles, β -carotenos, tocoferoles, hidrocarburos, etc.) que constituyen la denominada fracción insaponificable.

Figura 50.- Fracciones de compuestos polares y no polares de aceite de girasol separados mediante cromatografía en capa fina.



El aceite de girasol sin usar presentó un valor de compuestos polares de partida de 4,05 mg/100 mg de aceite. Según Lumley (1988), el contenido de compuestos polares en un aceite no usado debe oscilar entre 0,4 y 6,4%, por lo que en nuestro estudio, se partió de un aceite de girasol de aceptable calidad.

Tabla 18. Variación de las diferentes fracciones (**triglicéridos no polares, polar eluído, polar retenido y polar total (polar eluído + polar retenido)** de un aceite de girasol a lo largo de 75 frituras sucesivas de patatas con **recambio frecuente de aceite**.

N° de fritura	N	Composición ^a			
		Triglicéridos no polares	Fracción polar eluído	Fracción polar retenido	Fracción polar total
0	1	95,95	3,75	0,30	4,05
20	1	83,57	15,74	0,68	16,43
30	1	79,12	18,25	2,63	20,88
50	1	80,24	19,39	0,37	19,76
75	1	79,94	19,25	0,81	20,06

^a Los valores están expresados en mg/ 100 mg de aceite.

N: número de determinaciones

Cuando las frituras se realizaron con recambio frecuente de aceite (tabla 18), se produjo un aumento brusco de la cantidad de compuestos polares del aceite durante las veinte primeras frituras, de 4,05 a 16,43 mg/100 mg de aceite. Sin embargo, durante las diez frituras siguientes, los compuestos polares no aumentaron de forma tan notoria pasando a 20,88 mg/100 mg de aceite en la fritura 30. A partir de ese momento y hasta el final del experimento (75 frituras de patatas) el contenido de compuestos polares de la muestra se

mantuvo constante (19,76 y 20,06 mg/100 mg de aceite en al aceite procedente de 50 y 75 frituras de patatas respectivamente).

Paralelamente, el contenido en triglicéridos no alterados de los aceites procedentes de este estudio experimentó un comportamiento similar, pero en sentido contrario al de los compuestos polares. Así, se pasó de 95,95 a 83,57, 79,12, 80,24 y 79,94 mg de triglicéridos no polares/100 mg de aceite entre el aceite de girasol de partida y después de usarse 20, 30, 50 y 75 veces respectivamente para freir patatas con recambio frecuente de aceite.

Tabla 19. Variación de las diferentes fracciones (**triglicéridos no polares, polar eluído, polar retenido y polar total (polar eluído + polar retenido)** de un aceite de girasol a lo largo de 60 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	N	Composición ^a			
		Triglicéridos no polares	Fracción polar eluído	Fracción polar retenido	Fracción polar total
0	1	95,95	3,75	0,30	4.05
10	1	88,44	11,05	0,52	11.56
30	1	81,13	17,30	1,58	18.87
50	1	74,64	24,13	1,20	25.36
60	1	72,31	27,28	0,41	27.69

^a Los valores están expresados en mg/ 100 mg de aceite.

N: número de determinaciones.

Por otro lado, cuando las frituras de patatas se realizaron sin renovación del aceite de la freidora (tabla 19) la fracción de compuestos polares de las diferentes muestras de aceite analizadas se incrementó con el número de frituras pasando desde un valor de 4,05

mg/100 mg de aceite en la muestra inicial, a 11,56, 18,87, 25,36 y 27,69 mg/100 mg de aceite para las muestras procedentes de 10, 30, 50 y 60 frituras de patatas respectivamente.

De igual forma, la fracción de triglicéridos no polares de dichos aceites experimentaron una variación del mismo orden pero de sentido contrario a la producida en los compuestos polares (tabla 19).

Estos resultados están de acuerdo con lo indicado por diferentes autores (Arroyo, 1991; Cuesta y col., 1991a; Fedeli, 1988; Garrido-Polonio, 1991; Sánchez-Muniz y col., 1995; Smith y col., 1986) acerca de la variación prácticamente lineal del contenido en compuestos polares de los aceites de fritura cuando estos no se renuevan.

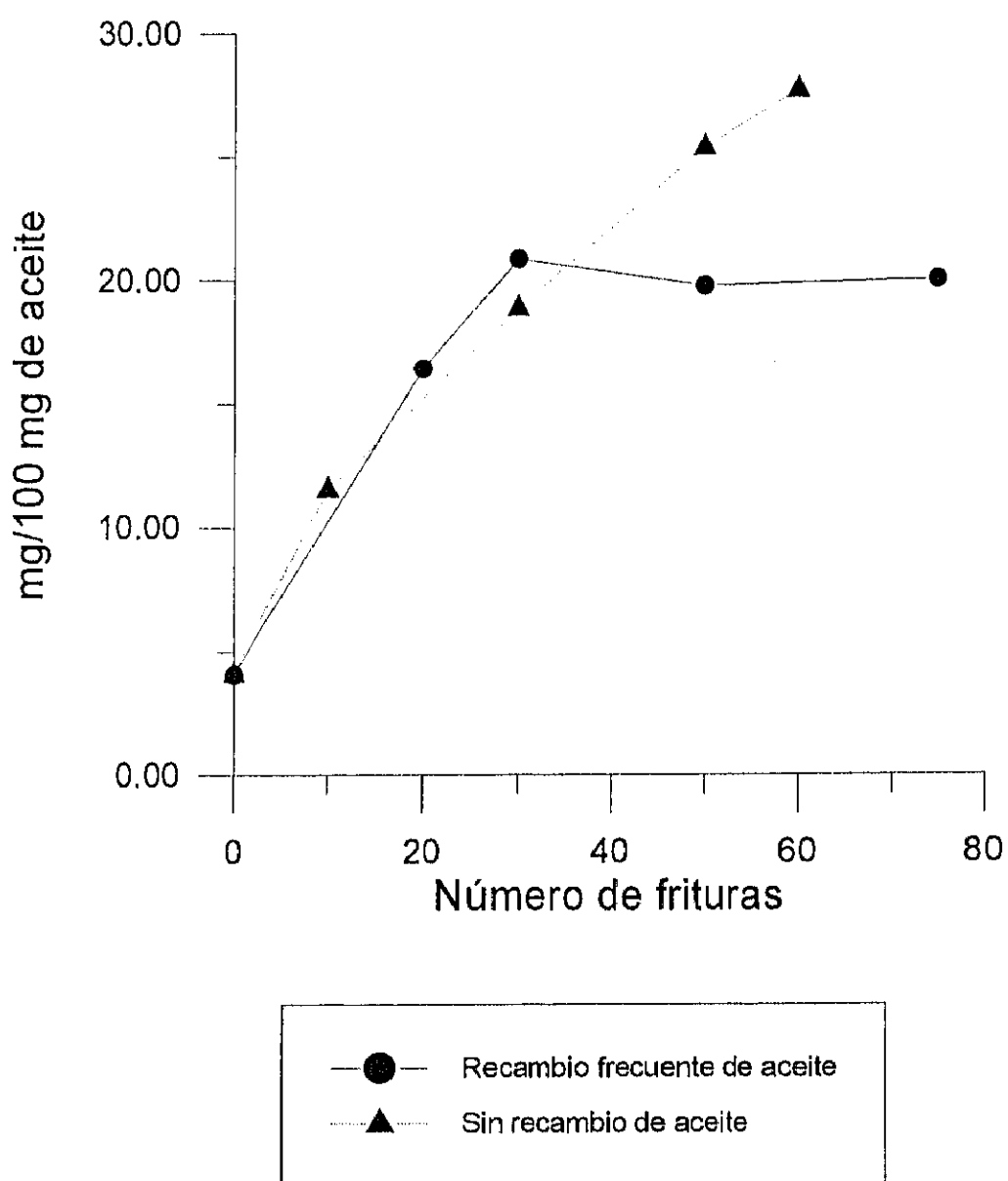
En la figura 51 se representa la comparación entre la evolución del contenido en compuestos polares del aceite de girasol utilizado para freir patatas según las dos metodologías descritas.

Como se puede observar en dicha figura, mientras que la fritura de patatas sin recambio de aceite produjo un incremento continuo de la alteración del aceite del baño de la freidora, la renovación frecuente frena la degradación producida llegando un momento que se estabiliza y no aumenta, aún después de realizar 45 frituras más de patatas con dicho aceite. Merece señalarse que, durante las primeras frituras, la alteración fue similar utilizando un método u otro.

Se debe destacar que cuando se realizan frituras sucesivas de patatas en aceite de girasol, y dicho aceite no se renueva, después de realizar 50 frituras de patatas se alcanzó el valor de 25% de compuestos polares marcado por la legislación como límite para desechar una grasa de fritura (Dobarganes y col., 1989; Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989). Sin embargo, según nuestro estudio, dicho valor límite no se alcanzaría nunca cuando las frituras se realizan renovando frecuentemente el aceite, ya que, de esta forma, la alteración del aceite se estabiliza en torno al 20% de compuestos polares.

De acuerdo con estos datos, la adición de aceite sin usar a la freidora con el fin de compensar las pérdidas originadas por la cantidad de aceite que es absorbido por los alimentos sería una buena práctica culinaria, ya que produce una dilución de la alteración producida (Billek, 1985; Pérez-Camino y col., 1987; Robertson, 1967; Sotirhos y col., 1986). Sin embargo, otros autores como Stevenson y col. (1984) opinan que este

Figura 51.- Comparación entre el contenido en compuestos polares del aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas con y sin recambio de aceite.



procedimiento podría incrementar la degradación del aceite debido al efecto catalítico de los productos de la alteración presentes en los aceites termooxidados.

Los datos de este estudio sugieren que el hecho de utilizar una modalidad u otra de fritura (con o sin renovación de aceite) no tiene importancia cuando el número de frituras realizado es pequeño. Sin embargo, después de 30 frituras, la renovación frecuente de aceite parece ser un método más beneficioso ya que el nivel de compuestos polares existente en el aceite se mantiene siempre por debajo del límite marcado por la legislación para desechar una grasa de fritura.

IV.1.5 DETERMINACION DE PRODUCTOS DE ALTERACION TERMOOXIDATIVA E HIDROLITICA.

La determinación de los compuestos polares, como se ha indicado anteriormente, es una medida de la alteración total de las grasas utilizadas en frituras. sin embargo, únicamente mediante la caracterización de los diferentes compuestos que forman la fracción polar se pone de manifiesto el tipo de alteración sufrida por el medio de fritura.

La introducción de la técnica de HPSEC ha permitido cuantificar los diferentes compuestos de alteración: polímeros y dímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (Arroyo y col., 1992; Christopoulou y Perkins, 1986; Gertz, 1986; Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Perkins y Pinter, 1988; Perrin y col. 1984; Rojo y Perkins, 1987; Sánchez-Muniz y col., 1993a; White, 1991).

IV.1.5.1 Estudio de los factores de respuesta de los diferentes compuestos de los aceites.

A partir de los estudios realizados con sustancias patrón que fueron descritos en el apartado III.1.3.3.2 de Materiales y Métodos, la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para los distintos compuestos ([1], [2], [3], [4]), utilizando como referencia el valor obtenido en el caso de los triglicéridos, permitió obtener los factores de

respuesta relativos en el detector de índice de refracción, para los diferentes patrones empleados , que aparecen en la tabla 20:

Tabla 20. Factores de respuesta en el detector de índice de refracción, de las diferentes mezclas patrón empleadas.

Patrón	Pendiente	Factor de respuesta relativo
Triglicéridos	13550	1
Diglicéridos	14110	1.04
Monoglicéridos	14880	1.10
Acidos grasos	11970	0.88

Márquez Ruiz (1990) estudió también la respuesta del detector de índice de refracción a mezclas de diglicéridos y triglicéridos puros. Dicho autor señala que, aunque podrían utilizarse factores independientes para los dos grupos de compuestos, cuando se mezclan todos los datos se puede deducir que los valores obtenidos al utilizar una única calibración para todos los compuestos, no serían significativamente distintos a los que se encontrarían utilizando las rectas específicas para cada grupo de compuestos. Márquez Ruiz (1990) estima, por ello, la concentración de diferentes componentes de la muestra asumiendo un factor de respuesta similar para todos ellos.

Christopoulou y Perkins (1986) analizaron mezclas de ésteres metílicos, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos conteniendo diferentes ácidos grasos. Cuando dichas mezclas se analizaron mediante HPSEC utilizando un detector de índice de refracción, cada una de ellas se resolvió como un pico cromatográfico. Estos autores, encontraron diferentes factores de respuesta frente a monolaurina, para la trioleína, trilinoleína y trilinolenina de 0,83, 1,42 y 2,85 respectivamente. Con posterioridad, calcularon la concentración de los diferentes componentes en base a la composición en ácidos grasos en la muestra determinada por cromatografía gaseosa. Iguales consideraciones realizan para

diglicéridos, monoglicéridos y ésteres metílicos, para calcular el contenido de dichos compuestos en la muestra.

Por su parte, Dobarganes y col. (1988) señalan que, debido a la complejidad de las muestras de aceite alterados por fritura o calentamiento, el calculo de los factores de respuesta de cada uno de los diferentes compuestos que forman dichas muestras es igualmente complejo, y, por ello, los resultados cuantitativos aunque muy reproducibles, deben ser considerados únicamente como aproximados.

Hopia y col. (1993) indican que debido a la heterogeneidad de las fracciones obtenidas por HPSEC, debe ser esperada una desviación estándar entre 9% y 13% en los resultados cuantitativos.

Como se ha indicado anteriormente, los factores de respuesta relativos encontrados para los diferentes patrones se encuentran en el intervalo 0,88-1,10, lo cual se asemeja por tanto a lo observado por diferentes autores. Teniendo en cuenta:

- i) la bondad de los ajustes lineales encontrados para los diferentes patrones
- ii) la similitud de las pendientes obtenidas, así como los factores de respuesta relativos

Puede asumirse que el detector de índice de refracción, utilizado en nuestras condiciones experimentales, detecta y cuantifica de manera equivalente los cuatro tipos de compuestos.

IV.1.5.2 Determinación de productos de alteración termooxidativa e hidrolítica en el aceite de girasol.

Los cromatogramas obtenidos por HPSEC a partir de la fracción alterada del aceite sin usar y de los procedentes de 75 y 60 frituras con y sin recambio de aceite respectivamente se muestran a continuación en las figura 52.

En cada cromatograma aparecen una serie de picos correspondientes a las distintas fracciones obtenidas que fueron las siguientes: polímeros de triglicéridos (1), dímeros de triglicéridos (2), triglicéridos oxidados (3), diglicéridos (4) y ácidos grasos libres (5).

Los polímeros y dímeros de triglicéridos, y los triglicéridos oxidados son productos característicos de la alteración termooxidativa de las grasas, mientras que los diglicéridos y

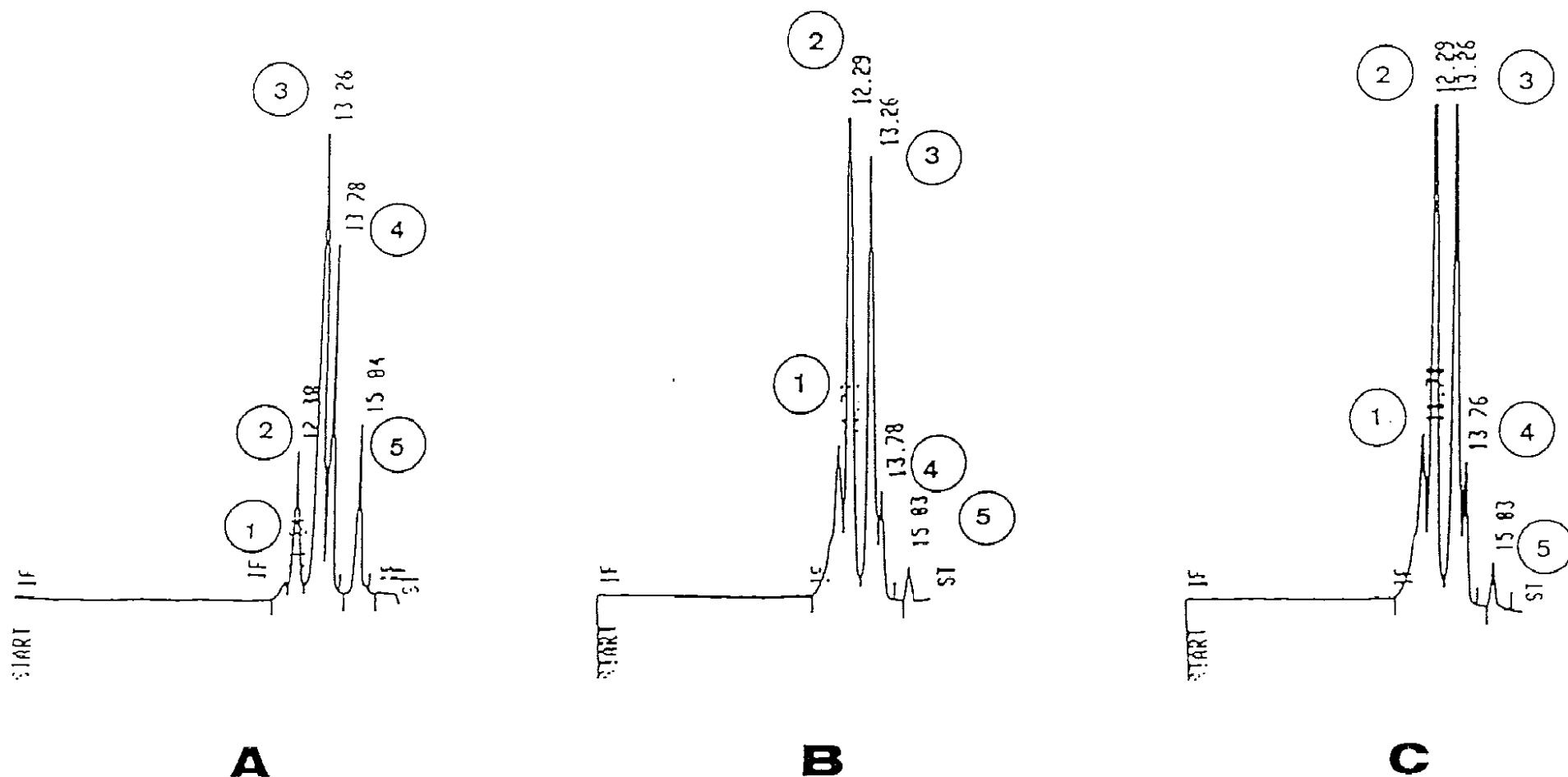


Figura 52.- Cromatogramas de HPSEC de las fracciones polares del aceite de girasol sin usar (A), y después de 75 (B) y 60 (C) frituras de patatas con y sin recambio de aceite, respectivamente.

los ácidos grasos libres se liberan como consecuencia de la alteración hidrolítica (Dobarganes y col., 1988).

En las tablas 21 y 22 aparece la distribución de las diferentes fracciones que constituyen el componente polar del aceite de girasol sin usar y procedente de diferentes frituras de patatas con y sin renovación de aceite.

Cuando las frituras de patatas se realizaron con renovación frecuente de aceite (tabla 21), la fracción polar de dichos aceites se enriqueció notablemente en compuestos de polimerización. Así, los polímeros de triglicéridos que representaban el 1,62% de la fracción polar del aceite de girasol de partida, pasaron a un 17,99% cuando el aceite se utilizó 75 veces para freír patatas. En cuanto a los dímeros de triglicéridos, de un 13,40% de la fracción polar del aceite de girasol sin usar pasaron a un 39,08% en el aceite de la fritura 20, permaneciendo constante su proporción hasta el final del estudio en las sucesivas frituras.

Tabla 21. Evolución de la composición porcentual de los compuestos específicos de la alteración de un aceite de girasol utilizado en 75 frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Nº de fritura	N	Alteración termooxidativa ^a			Alteración hidrolítica ^a	
		Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados	DG	Ácidos grasos
0	1	1,62	13,40	47,83	24,66	12,49
20	1	10,31	39,08	39,17	8,32	3,12
30	1	13,90	39,39	36,05	7,36	3,30
50	1	16,64	38,95	34,79	7,37	2,25
75	1	17,99	39,32	32,81	7,37	2,51

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de componente polar.

N: número de determinaciones.

Los triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres que constituían el 47,83%, 24,66% y 12,49% respectivamente de la fracción polar del aceite de girasol sin usar, después de 75 frituras de patatas sin recambio de aceite, experimentaron un descenso en su composición porcentual respecto a la fracción polar pasando a constituir el 32,81%, 7,37% y 2,51% de dicha fracción, respectivamente (tabla 22).

Tabla 22. Evolución de la **composición porcentual de los compuestos específicos** de la alteración de un aceite de girasol utilizado en 60 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	N	Alteración termooxidativa ^a			Alteración hidrolítica ^a	
		Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados	DG	Acidos grasos
0	1	1,62	13,40	47,83	24,66	12,49
10	1	4,75	29,62	50,00	11,42	4,21
30	1	11,88	40,69	37,77	7,25	2,41
50	1	17,19	40,42	34,23	6,36	1,79
60	1	19,77	39,99	32,18	6,13	1,93

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de componente polar.

N: número de determinaciones.

Cuando las frituras de patatas se realizaron sin renovación del aceite de las freidoras (tabla 22), la distribución de los diferentes componentes de la fracción polar del aceite de girasol evolucionó de forma similar a lo descrito con recambio frecuente de aceite. Es decir, se produjo un enriquecimiento del componente polar de los aceites en productos de polimerización, la proporción de dímeros de triglicéridos se estabilizó a partir de la fritura

30, y los triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres aparecieron en menor proporción al aumentar el número de frituras.

Arroyo (1991) y Garrido-Polonio y col. (1994) estudiando el aceite extraído de patatas fritas en girasol y dicho aceite procedente del baño de la freidora respectivamente, encontraron un aumento significativo del porcentaje de polímeros y dímeros de triglicéridos de dicho aceite acompañado de un descenso porcentual de los triglicéridos oxidados, diglicéridos y ácidos grasos libres.

Cuando la composición de los diferentes productos de la alteración termooxidativa e hidrolítica se expresó como mg/100 mg de aceite, los resultados obtenidos aparecen en las tablas 23 y 24.

En la tabla 23 aparece la composición del aceite de girasol utilizado en sucesivas frituras de patatas con renovación frecuente del aceite del baño de la freidora. Los resultados obtenidos indican que la renovación frecuente del aceite del baño de la freidora implica un aumento de la cantidad de productos alterados en dicho aceite durante las primeras frituras. Así los polímeros de triglicéridos se incrementaron de 0,07 a 2,90 mg/100 mg de aceite; los dímeros de triglicéridos de 0,54 a 8,22 mg/100 mg de aceite, y los triglicéridos oxidados de 1,94 a 7,13 mg/100 mg de aceite. Sin embargo, después de 30 frituras de patatas, la cantidad de triglicéridos oxidados y diméricos presentes en el aceite tendieron a disminuir, probablemente porque dichos compuestos se polimerizan contribuyendo al incremento de polímeros de triglicéridos (de 2,90 a 3,6 mg/100 mg de aceite).

En cuanto a los productos específicos de la alteración hidrolítica (diglicéridos y ácidos grasos libres), apenas se modifican por la fritura de patatas (tabla 23 y figura).

Por el contrario, cuando las frituras se realizaron sin renovación del aceite del baño de la freidora (tabla 24), se produjo un incremento marcado de la cantidad de polímeros de triglicéridos (de 0,07 a 5,47 mg/100 mg de aceite), dímeros de triglicéridos (de 0,54 a 11,07 mg/100 mg de aceite) y triglicéridos oxidados (de 1,94 a 8,91 mg/100 mg de aceite) todos ellos característicos de la alteración termooxidativa. Si bien, como se puede observar en la tabla 24, a partir de la fritura 30, la formación de polímeros de los triglicéridos es mayor que la de los dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados.

Tabla 23. Evolución del contenido en los compuestos específicos de la alteración de un aceite de girasol utilizado en 75 frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Nº de fritura	N	Alteración termooxidativa ^a			Alteración hidrolítica ^a	
		Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados	DG	Ácidos grasos
0	1	0,07	0,54	1,94	1,00	0,51
20	1	1,69	6,42	6,44	1,37	0,51
30	1	2,90	8,22	7,53	1,54	0,69
50	1	3,29	7,70	6,87	1,46	0,44
75	1	3,61	7,89	6,58	1,48	0,50

^a los valores están expresados en mg/100 mg de aceite.

N: número de determinaciones.

Kuprancyez y col. (1986) calentando aceite de girasol, observaron que dicho aceite después de 8 y 16 horas de oxidación térmica contenía cantidades sustancialmente más elevadas de dímeros de triglicéridos y polímeros de triglicéridos que la muestra de partida. Estos autores indican además que, durante las ocho primeras horas de calentamiento, se forman mayor cantidad de dímeros de triglicéridos que de oligómeros complejos de mayor peso molecular, mientras que desde la octava a la decimosexta horas de calentamiento, la formación de dímeros descendía y la cantidad de triglicéridos con alto grado de polimerización continuó incrementándose de forma mantenida. Este estudio, por tanto, apoyaría nuestros resultados.

Tabla 24. Evolución del contenido en los compuestos específicos de la alteración de un aceite de girasol utilizado en 60 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite.**

Nº de fritura	N	Alteración termooxidativa ^a			Alteración hidrolítica ^a	
		Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados	DG	Acidos grasos
0	1	0,07	0,54	1,94	1,00	0,51
10	1	0,55	3,42	5,78	1,32	0,49
30	1	2,24	7,68	7,13	1,37	0,45
50	1	4,36	10,25	8,68	1,61	0,45
60	1	5,47	11,07	8,91	1,70	0,53

^a los valores están expresados en mg/100 mg de aceite.

N: número de determinaciones.

De forma similar, White y Wang (1986), utilizando aceite de soja calentado hasta 56 horas a $182 \pm 2^\circ\text{C}$ encontraron que los triglicéridos diméricos se incrementaron durante las 35 primeras horas de calentamiento, descendiendo posteriormente. Según estos autores, este modelo representa un estado casi mantenido en la formación de compuestos diméricos y una formación posterior en mayor grado de compuestos polimerizados.

Asimismo Gere (1984) describió la presencia de triglicéridos diméricos en aceite de girasol usado en frituras.

Ya que los productos más abundantes de la oxidación térmica en las grasas de fritura son los compuestos polimerizados (Kyoko-Hara y Denshiro, 1989), se ha sugerido que la determinación de polímeros sería un buen método para evaluar la calidad de dichas grasas (Combe y col., 1981; Hara y col., 1989; Nawar, 1984; Perrin y col., 1984; Sebedio y col., 1987; White y Wang, 1986).

Los diglicéridos y ácidos grasos libres, como sucedió cuando se renovó frecuentemente el aceite, apenas variaron en los aceites después de las frituras.

En la figura 53, se representa una comparación de la composición de los productos específicos de la alteración termooxidativa e hidrolítica del aceite de girasol empleado en frituras sucesivas de patatas con y sin recambio de aceite.

Los resultados obtenidos indican que al freir patatas en aceite de girasol, en dicha grasa culinaria tiene lugar un proceso termooxidativo en mayor grado que un proceso hidrolítico. Dobarganes y col. (1988), en un estudio realizado con diferentes aceites con el mismo contenido en compuestos polares, llegaron a la conclusión de que en el aceite de girasol predomina la alteración térmica y oxidativa, mientras que en el aceite de oliva predomina la hidrolítica, lo cual influye en su vida útil, siendo más larga la del aceite de oliva.

Cuando se relacionaron las cantidades de los diferentes grupos de compuestos presentes en el aceite de girasol de partida y después de frituras sucesivas con y sin recambio de aceite los resultados aparecen en las tablas 25 y 26.

Tabla 25. Cocientes establecidos entre la cantidad de triglicéridos no polares y diferentes grupos de compuestos alterados, y entre los compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica en el aceite de girasol sin usar y procedente de frituras sucesivas de patatas con recambio frecuente de aceite.

Cocientes	Número de frituras				
	0	20	30	50	75
TG no polares/compuestos polares.	23,69	5,09	3,79	4,06	3,99
TG no polares/comp. alter.termoxidativa.	37,63	5,74	4,24	4,49	4,42
TG no polares/comp.alter. hidrolítica.	63,54	44,45	35,48	42,23	40,37
Comp. alter. termox./comp. alter. hidrol.	1,69	7,74	8,36	9,40	9,13

Figura 53.- Comparación entre la alteración termooxidativa e hidrolítica del aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas con y sin recambio de aceite.

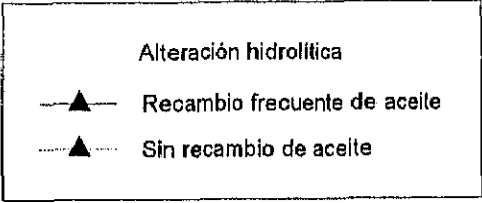
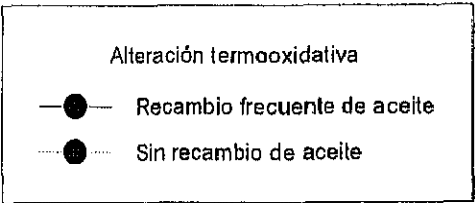
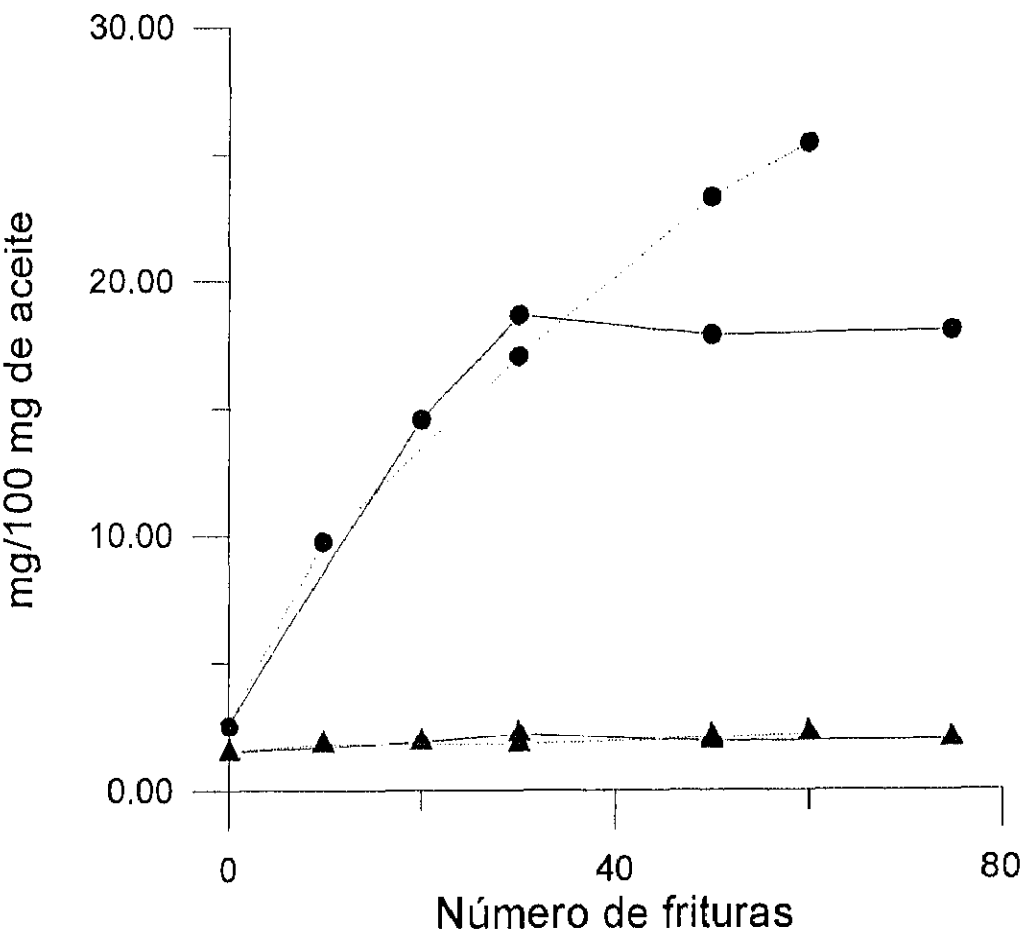


Tabla 26. Cocientes establecidos entre la cantidad de triglicéridos no polares y diferentes grupos de compuestos alterados, y entre los compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica en el aceite de girasol sin usar y procedente de frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Cocientes	Número de frituras				
	0	10	30	50	60
TG no polares/compuestos polares.	23,69	7,65	4,30	2,94	2,61
TG no polares/comp. alter.termoxidativa.	37,63	9,07	4,76	3,20	2,84
TG no polares/comp.alter. hidrolítica.	63,54	48,86	44,58	36,23	32,43
Comp. alter. termox./comp. alter. hidrol.	1,69	5,39	9,37	11,31	11,41

En dichas tablas se pone de manifiesto lo que se ha venido comentando acerca de la mayor alteración producida en el aceite de girasol cuando se emplea en frituras sucesivas de patatas sin recambio, frente a la forma de freír adicionando cada cierto tiempo aceite nuevo en la freidora. Así, por ejemplo, mientras que la relación triglicéridos no polares/compuestos de alteración termooxidativa descendió ≈ 8 veces durante 75 frituras con recambio de aceite, el descenso fue de ≈ 13 veces cuando no se produjo recambio de aceite.

IV.1.6 CORRELACIONES ENTRE LAS DIFERENTES DETERMINACIONES REALIZADAS.

La utilización de índices analíticos "clásicos", como los empleados en este estudio, índices de refracción y acidez, han sido descritos y criticados por diferentes autores (Dobarganes y col., 1984a; Pérez-Camino y col., 1988b; White, 1991). Estos investigadores señalan que dichos índices, por un lado, no indican la alteración específica (termooxidativa o hidrolítica) de la grasa de fritura, y por otro, como el propio aceite inicial posee en mayor

o menor cuantía algunas de estas características fisicoquímicas, es necesario conocer su valor inicial y que esté dentro de los límites establecidos para una grasa de fritura de buena calidad.

Pérez-Camino y col. (1988b) indican que los índices simples pueden ser usados para el control de la alteración de la grasa durante su uso, siempre que se controlen las variables implicadas en el proceso de fritura.

En trabajos posteriores en los que evaluaron muestras procedentes de freidoras industriales y otras procedentes de freidoras domésticas, Pérez-Camino y col. (1988b) demostraron que los índices elegidos: acidez libre, punto de humo y prueba colorimétrica de Perevalov, se correlacionaban bien con los glicéridos polares y ésteres metílicos polares y no polares, siendo por tanto aplicables cuando existen valores bien definidos para el aceite crudo, mientras que es necesario utilizar un método cromatográfico para la evaluación de muestras de historia desconocida.

Cuesta y col. (1991b) señalan que estos índices informan sobre la evolución de la alteración de un aceite de manera equivalente a si se utilizara la valoración cromatográfica de ésteres metílicos alterados o de triglicéridos polares.

Ante las evidentes modificaciones tanto de los índices de refracción y acidez libre, como de los métodos mas específicos (porcentaje de triglicéridos no polares y polares), parecía interesante estudiar las correlaciones existentes entre ambos tipos de métodos en las dos modalidades de fritura, con y sin recambio frecuente de aceite.

En la tabla 27 se puede observar que no existe correlación significativa entre el índice de refracción y el contenido de compuestos polares ($r=0,449$) para la modalidad de fritura con recambio frecuente de aceite. Tampoco se encontró correlación entre el índice de refracción y los diferentes compuestos de alteración termooxidativa o hidrolítica en esta modalidad de fritura.

Sin embargo, cuando las frituras se realizaron sin recambio de aceite, sólo se encontraron correlaciones significativas entre el índice de refracción y los compuestos polares o los polímeros de triglicéridos (tabla 27).

Según se ha comentado anteriormente, el índice de refracción señalaría la presencia de polímeros en los aceites alterados (Gutiérrez Gonzalez-Quijano y Dobarganes, 1988).

Tabla 27. Correlaciones producto-momento de Pearson para los índices de refracción y acidez con los diferentes compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica en frituras de patatas realizadas con aceite de girasol según las modalidades: con y sin recambio frecuente de aceite.

Componentes	Con recambio		Sin recambio	
	Índice de refracción	Índice de acidez	Índice de refracción	Índice de acidez
Compuestos polares	0,4490	0,9098 ^a	0,9188 ^a	0,9768 ^a
Polímeros de TG	0,6130	0,9848 ^a	0,9154 ^a	0,8815
Dímeros de TG	0,4276	0,9063 ^a	0,7518	0,6667
Triglicéridos oxidados	0,2935	0,8299 ^a	0,6662	0,5552
Diglicéridos	0,5434	0,9450 ^a	0,7682	0,6442
Ácidos grasos libres	- 0,0451	0,2109	0,1166	- 0,2942

^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$

El índice de acidez presentó correlación elevada y positiva con los compuestos polares ($r=0,9088$; $p < 0,01$). Asimismo, presentó correlaciones altas con los diferentes compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica a excepción de los ácidos grasos libres cuando las frituras se realizaron con recambio frecuente de aceite. Sin embargo, cuando las frituras se realizaron sin recambio de aceite, este índice no presentó correlaciones significativas con los diferentes compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica (tabla 27).

Gutiérrez Gonzalez-Quijano y Dobarganes (1988) demostraron que el índice de acidez está relacionado de forma directa con la oxidación de los ácidos grasos.

Sánchez-Muniz y col. (1994) realizando 15 frituras de patatas en aceite de girasol sin renovar el aceite, encontraron una correlación elevada y significativa entre la alteración total y el índice de acidez.

Los resultados del presente estudio sugieren la utilidad de la determinación del índice de acidez cuando las frituras se realizan sin renovación de aceite, pero no en el caso de que el aceite del baño de la freidora se renueve frecuentemente.

En la tabla 28 se pueden observar las correlaciones existentes entre los compuestos específicos de la alteración producida y el contenido de compuestos polares, apreciándose las bajas correlaciones que se establecen entre los ácidos grasos libres presentes en los aceites y esta variable, en las dos modalidades de fritura. Sin embargo, podemos observar que el resto de correlaciones que aparecen en dicha tabla 28 son muy elevadas, sobre todo las que se refieren a compuestos típicos de la alteración termooxidativa (polímeros y dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados).

También encontramos que, tanto la alteración termooxidativa como la hidrolítica, se correlacionan de forma elevada y significativa con los compuestos polares en ambas modalidades de fritura.

Tabla 28. Correlaciones producto-momento de Pearson entre los distintos compuestos de alteración termoxidativa e hidrolítica y los compuestos polares en frituras de patatas realizadas con aceite de girasol con las modalidades: con y sin recambio frecuente de aceite.

	Con recambio	Sin recambio
Polimeros de TG	0,9452	0,9691
Dímeros de TG	0,9992	0,9969
Triglicéridos oxidados	0,9823	0,9738
Alteración termoxidativa	1,0000	0,9999
Diglicéridos	0,9777	0,9687
Acidos grasos libres	0,4106*	- 0,1644*
Alteración hidrolítica	0,9615	0,9449

* Correlación no significativa. El resto poseían significancia $p < 0,01$.

IV.2 FRITURA DE PATATAS EN OLEINA DE PALMA. ESTUDIO DE LA ALTERACION PRODUCIDA DESPUES DE SUCESIVAS FRITURAS SIN RENOVACION DE ACEITE.

Se estudió la alteración producida en una oleína de palma como consecuencia de su empleo en frituras sucesivas y discontinuas de patatas sin renovación de aceite. Dicha alteración se comparó posteriormente con la del aceite de girasol utilizado en frituras siguiendo el mismo esquema experimental.

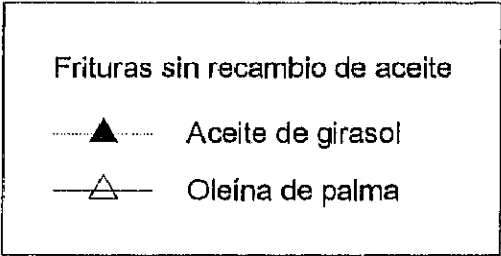
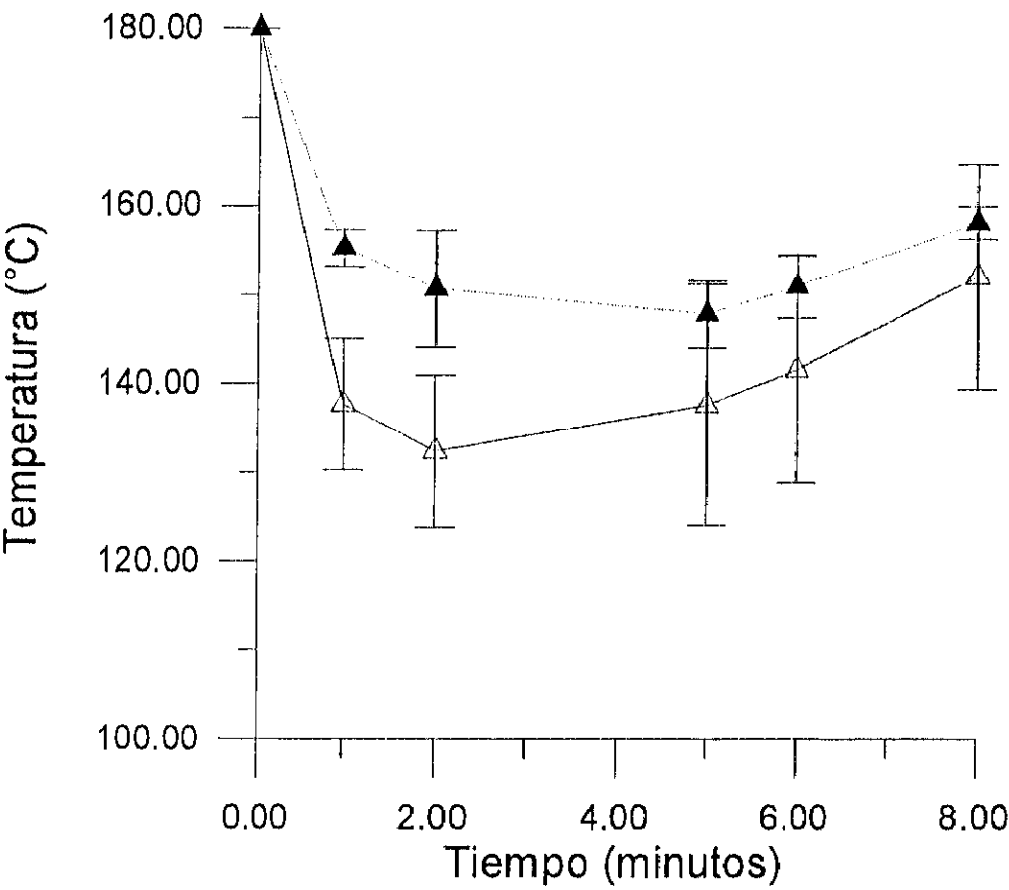
IV.2.1. VARIACION DE LA TEMPERATURA DEL ACEITE DURANTE EL PROCESO DE FRITURA.

Los valores de la temperatura presentada por la oleína de palma en la freidora durante el primer, segundo, quinto, sexto y octavo minuto de fritura correspondientes a series de diez frituras, aparecen en la tabla 29. En dicha tabla se puede apreciar que la temperatura presentada por la oleína de palma en las diferentes series de frituras, no varió significativamente de unas a otras.

Asimismo, en la figura 54 se representa la evolución de la temperatura promedio de la oleína de palma durante la fritura y ésta se compara con la evolución de la misma presentada por el aceite de girasol utilizado en frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite. En dicha figura se puede comprobar que, en ambos casos, la temperatura del aceite del baño de fritura que inicialmente era de 180°C, sufrió un profundo descenso como consecuencia de la adición del alimento. Posteriormente, mientras que en el aceite de girasol se estabilizó entre el segundo y quinto minuto de fritura para luego elevarse después, en la oleína de palma comenzó a elevarse la temperaturaya ya desde el segundo minuto de fritura. Como se puede observar en dicha figura (54) los valores de temperatura media registrados por la oleína de palma, fueron inferiores en todos los casos a los que presentaba el aceite de girasol en las mismas condiciones.

El control de la temperatura del aceite durante el proceso de fritura es muy importante ya que, como ya ha sido comentado anteriormente en el apartado IV.1.1 de variación de la temperatura del aceite de girasol durante la fritura, la velocidad de degradación de los aceites

Figura 54.- Comparación entre la evolución de la temperatura del aceite del baño en frituras repetidas de patatas con aceite de girasol y oleína de palma sin recambio de aceite.



durante dicho procedimiento culinario es proporcional a la temperatura a la que se realiza el proceso (Gere, 1983a; Fedeli, 1988; Lomanno y Nawar, 1982; Perkins y Akkeren, 1965).

Tabla 29. Evolución de la temperatura de la oleína de palma del baño de fritura durante 90 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite**.

Nº de fritura	N	Temperaturas*				
		1º minuto	2º minuto	5º minuto	6º minuto	8º minuto
0-10	60	137,7 \pm 8,9 ^a	130,8 \pm 9,8 ^a	134,9 \pm 9,4 ^a	139,2 \pm 9,4 ^a	149 \pm 10,4 ^a
11-20	52	135,5 \pm 8,0 ^a	130,4 \pm 8,7 ^a	139 \pm 11 ^a	139 \pm 12 ^a	148 \pm 14 ^a
21-30	44	131,9 \pm 5,8 ^a	126,6 \pm 5,4 ^a	130,1 \pm 6,6 ^a	133,1 \pm 7,9 ^a	141 \pm 11 ^a
31-40	36	132,9 \pm 6,5 ^a	126,9 \pm 5,4 ^a	129,4 \pm 7,1 ^a	132,4 \pm 8,7 ^a	141 \pm 12 ^a
41-50	28	131,8 \pm 7,2 ^a	126,2 \pm 5,8 ^a	127,7 \pm 6,5 ^a	131,2 \pm 8,1 ^a	139 \pm 12,7 ^a
51-60	20	134,4 \pm 7,1 ^a	125,5 \pm 7,4 ^a	122,1 \pm 7,8 ^a	131,9 \pm 9,3 ^a	140 \pm 10,2 ^a
61-70	20	138 \pm 10 ^a	132,1 \pm 9,9 ^a	138 \pm 11 ^a	144 \pm 11 ^a	154 \pm 12,4 ^a
71-80	20	151 \pm 12 ^a	150 \pm 13 ^a	163 \pm 16 ^a	166 \pm 14 ^a	168 \pm 11 ^a
81-90	10	133,7 \pm 5,1 ^a	128,7 \pm 4,9 ^a	135,1 \pm 4,2 ^a	140,1 \pm 4,3 ^a	151 \pm 4,9 ^a

N: número de determinaciones. * Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. No se encontraron diferencias significativas para valores dentro de la misma columna según el análisis de varianza de muestras repetidas y el test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones.

IV.2.2 INDICES ANALITICOS DE CARACTER GENERAL.

IV.2.2.1 Indice de refracción.

En la tabla 30 aparecen los valores del índice de refracción de la oleína de palma sin usar y después de ser utilizada en 40 y 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Tabla 30. Evolución del índice de refracción de la oleína de palma utilizada en 90 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite.**

Número de fritura	Nº de determinaciones	Índice de refracción a 20°C
0	3	$1,4648 \pm 5,77 \times 10^{-5}^a$
40	3	$1,4659 \pm 2,31 \times 10^{-4}^b$
90	3	$1,4662 \pm 2,89 \times 10^{-4}^b$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

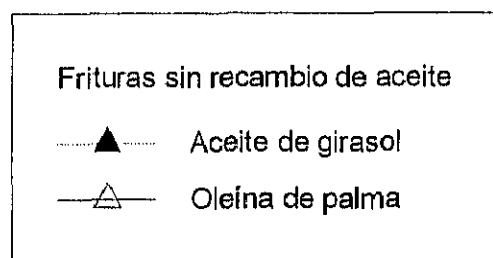
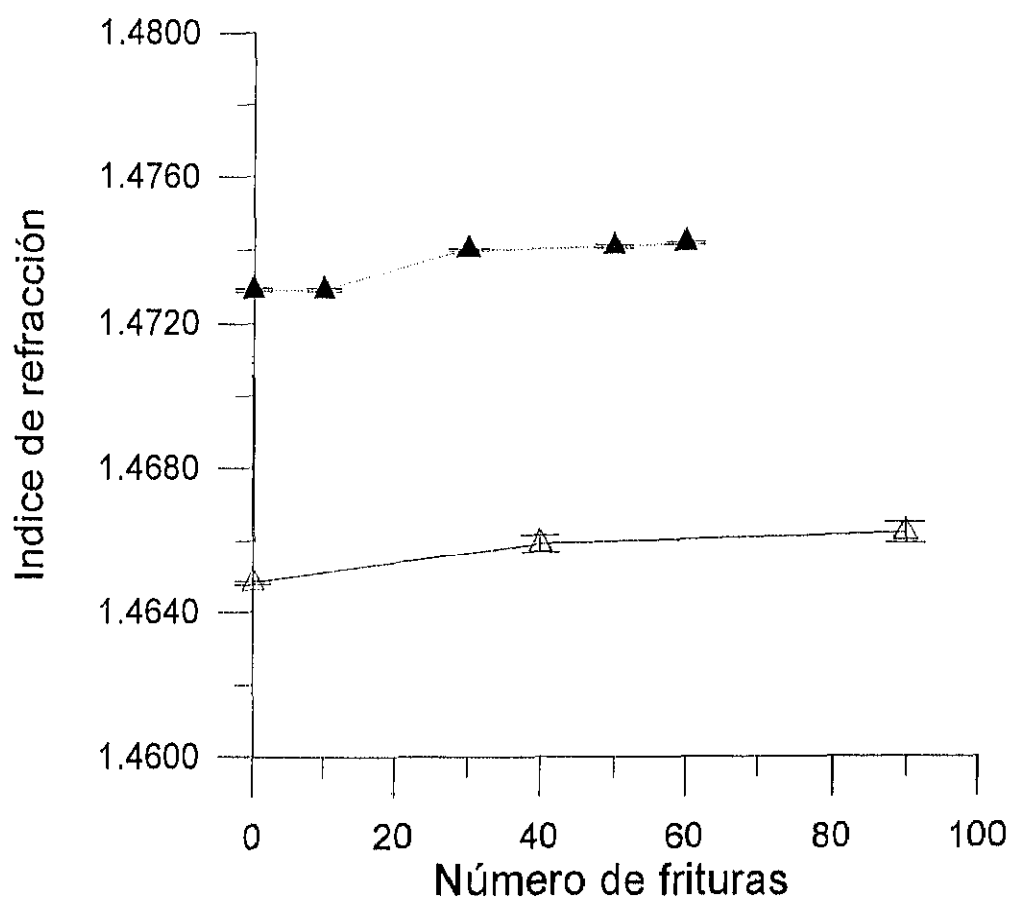
Como se puede observar en dicha tabla, el índice de refracción de la oleína de palma aumentó después de sucesivas frituras de patatas. Este aumento se produjo a nivel de la tercera cifra decimal pasándose de un valor de partida de 1,4648 a 1,4662 en la oleína de palma utilizada en 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Las variaciones de este índice producidas en los aceites utilizados en fritura tienen lugar como consecuencia de la formación de polímeros en los mismos (Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Permanyer y Boatella, 1977).

La mayor parte de los autores coinciden en que este índice apenas se modifica en condiciones normales de fritura (Coll Hellín y Rueda Clausell, 1984; Cuesta y col., 1991b; Varela y col., 1983).

Cuando se comparan la variaciones producidas en este índice en la oleína de palma y el aceite de girasol como consecuencia de frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite (figura 55), se ve que en ambos casos la variación entre dicho índice en el aceite original y el más alterado es muy pequeña siendo del 0,1% en la oleína de palma y del 0,09% en el aceite de girasol.

Figura 55.- Comparación entre el índice de refracción del aceite de girasol y la oleína de palma utilizados en frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite.



IV.2.2.2 Índice de acidez.

En la tabla 31 aparecen los valores del índice de acidez de la oleína de palma sin usar y después de ser utilizada en 40 y 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Tabla 31. Evolución del grado y del índice de acidez de la oleína de palma utilizada en 90 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Número de fritura	Nº de determinaciones	Grado de acidez (% ácido palmítico)	Índice de acidez
0	3	$0,13 \pm 0,004^a$	$0,29 \pm 0,010^a$
40	3	$0,23 \pm 0,010^b$	$0,50 \pm 0,020^b$
90	3	$0,63 \pm 0,001^c$	$1,38 \pm 0,001^c$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

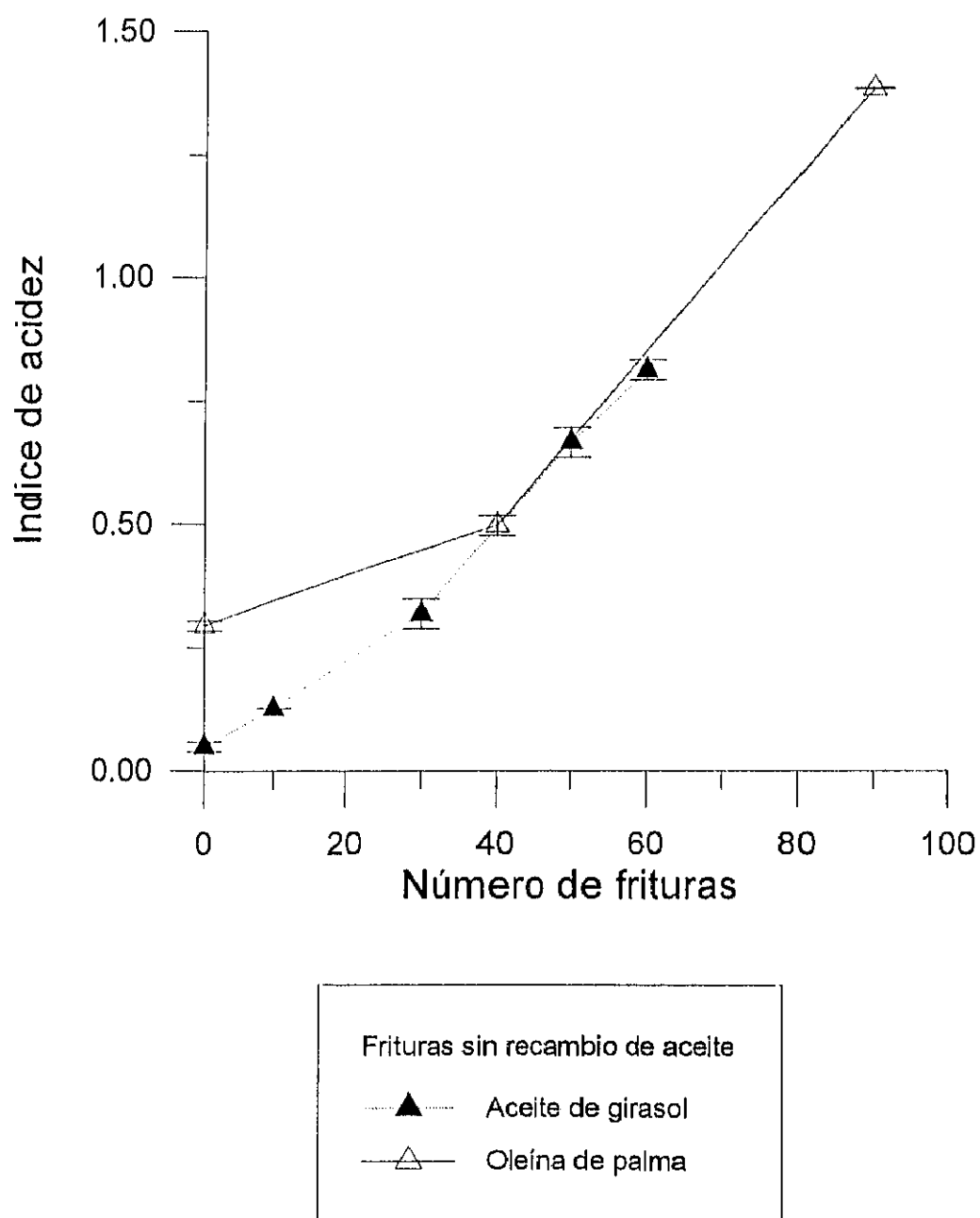
Como se puede observar en la tabla 31, el índice de acidez se incrementó significativamente al aumentar el número de frituras pasándose desde un valor de 0,29 en la oleína de palma de partida, hasta 1,38 después de la realización de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Yoon y col. (1987), que después de calentar oleína de palma doblemente fraccionada a 180°C durante 50 horas registraron, un incremento en su índice de acidez desde 0,23 hasta 1,30.

Las variaciones en el índice de acidez se producen como consecuencia de las alteraciones hidrolíticas que sufren los aceites durante la fritura (Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Permanyer y col., 1985).

La comparación entre las variaciones producidas en dicho índice en la oleína de palma y el aceite de girasol como consecuencia de su uso en frituras repetidas de patatas sin

Figura 56.- Comparación entre el índice de acidez del aceite de girasol y la oleína de palma utilizados en frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite.



recambio de aceite, aparecen en la figura 56. En dicha figura se puede observar que, en ambos casos, se produjo un incremento del índice de acidez como consecuencia de las frituras. Dicho incremento fue mayor en el aceite de girasol, ya que después de 60 frituras el valor de dicho índice aumentó ≈ 17 veces respecto al del aceite de partida, mientras que en la oleína de palma, los valores se incrementaron ≈ 5 veces después de 90 frituras de patatas. Estos resultados señalan la mucho mayor estabilidad de la oleína de palma que el aceite de girasol cuando son usados en frituras. Si bien, como se puede observar en la figura 56 la oleína de palma presentó un valor de índice de acidez de partida en torno a 6 veces mayor que el de aceite de girasol (0,29 *versus* 0,05).

A pesar de incrementarse con el número de frituras, numerosos autores opinan que la determinación del índice de acidez puede no ser una buena medida de la degradación producida en los aceites como consecuencia de las frituras (Castellón Arnau, 1989; Fritsch, 1981; White, 1991), ya que no es reflejo de la alteración total de los mismos.

IV.2.2.3 Prueba colorimétrica de Perevalov modificada.

En la tabla 32 se señalan las variaciones del color, siguiendo el método de Perevalov modificado (Meyer, 1979), que experimenta la oleína de palma a lo largo de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

La evolución del color -azul (1), azul-verdoso (2), verde-azulado (3), verde (4), verde-oliva (5), oliva (6), oliva-marrón (7) y marrón-rojizo (8)- está directamente relacionada con el estado de oxidación de la grasa y permite tener una impresión rápida del nivel de alteración de la misma.

Para la oleína de palma no usada se encontró el valor 1 dentro de la escala colorimétrica, mientras que después de 90 frituras este valor fue de 5.

Dado que las recomendaciones americanas establecen reemplazar la grasa cuando ésta adquiere un valor de dicho índice superior a 3, según esto, la oleína de palma utilizada en el presente estudio no sería apta para el consumo ya antes de la fritura 50. Sin embargo, como se comentará más adelante en el apartado IV.2.3.1, el análisis de los compuestos polares de la oleína de palma señala que dicha grasa no debería desecharse hasta después de 80 frituras.

A pesar de que algunos autores (Arroyo, 1991; Garrido-Polonio, 1991; Pérez-Camino y col., 1988b) han encontrado buenas correlaciones entre dicho índice y el número de frituras realizadas, nuestros datos señalan discrepancias entre este método y la determinación de los compuestos polares, ya que no coinciden en el momento fijado para desechar una grasa para el consumo alimentario.

Tabla 32. Prueba colorimétrica de Perevalov modificada de la oleína de palma a lo largo de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Nº de determinaciones	Color	Valor numérico
0	3	AZUL	1
5	3	AZUL	1
10	3	AZUL-VERDOSO	2
20	3	AZUL-VERDOSO	2
30	3	VERDE-AZULADO	3
40	3	VERDE-AZULADO	3
50	3	VERDE	4
60	3	VERDE	4
70	3	VERDE-OLIVA	5
80	3	VERDE-OLIVA	5
90	3	VERDE-OLIVA	5

La evolución del valor de esta prueba (Meyer, 1979) es:

AZUL (1); AZUL-VERDOSO (2); VERDE-AZULADO (3); VERDE (4); VERDE-OLIVA (5); OLIVA (6); OLIVA-MARRON (7); MARRON-ROJIZO (8).

IV.2.3 METODOS ANALITICOS PARA LA EVALUACION DE LA ALTERACION TOTAL.

IV.2.3.1 Determinación cuantitativa de los triglicéridos no polares y de compuestos polares del aceite.

Esta técnica, como se ha venido comentando en la presente Memoria, es la recomendada por la IUPAC (1987b) y la legislación española (Ministerio de Relaciones con la Cortes y de Secretaría del Gobierno, 1989), para la evaluación de la alteración producida en las grasas como consecuencia de la fritura de los alimentos.

Según dicha técnica, se separaron mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, los triglicéridos no alterados del resto de los compuestos existentes en el aceite cuya polaridad es mayor, por lo que se denominan compuestos polares. La eficacia de la separación se comprobó, de igual forma que en el aceite de girasol ya comentado en el apartado IV.1.4.2, mediante cromatografía en capa fina.

En la tabla 33 se presentan los resultados de dicha determinación en la oleína de palma de partida y después de ser utilizada en sucesivas frituras de patatas.

Según dicha tabla, la fracción de triglicéridos no polares de la oleína de palma disminuyó significativamente a lo largo de las diferentes frituras desde un valor de $90,7 \pm 0,1$ mg/100 mg de aceite en la oleína de partida, hasta $73,6 \pm 0,3$ mg/100 mg de aceite en dicha grasa después de 90 frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite. Los compuestos polares, por otro lado, se incrementaron también de forma significativa pasando de $9,3 \pm 0,1$ mg/100 mg de aceite en la muestra basal, a $26,4 \pm 0,3$ mg/100 mg de aceite en la oleína de palma usada 90 veces.

Estos resultados están de acuerdo con lo indicado por diferentes autores (Arroyo, 1991; Cuesta y col., 1991a; Fedeli, 1988; Garrido-Polonio, 1991; Sánchez-Muniz y col., 1995; Smith y col., 1986) acerca de la variación prácticamente lineal del contenido en compuestos polares de los aceites de fritura cuando no existe renovación.

Tabla 33. Variación de las diferentes fracciones (triglicéridos no polares, polar eluido, polar retenido y fracción polar total (polar eluido + polar retenido) de oleína de palma a lo largo de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Composición*			
	Triglicéridos no polares	Fracción polar eluída	Fracción polar retenida	Fracción polar total
0	90,7 ± 0,1 ^a	8,9 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	9,3 ± 0,1 ^a
5	90,6 ± 0,1 ^a	8,7 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	9,4 ± 0,1 ^a
10	89,8 ± 0,2 ^b	9,4 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	10,2 ± 0,2 ^b
20	88,4 ± 0,4 ^c	10,9 ± 0,8 ^b	0,7 ± 0,5 ^a	11,6 ± 0,4 ^c
30	86,7 ± 0,7 ^d	12,2 ± 0,7 ^c	1,1 ± 0,1 ^a	13,3 ± 0,7 ^d
40	85,2 ± 0,9 ^e	13,7 ± 0,6 ^d	1,1 ± 0,6 ^a	14,8 ± 0,9 ^e
50	83,4 ± 0,6 ^f	15,9 ± 0,2 ^e	0,7 ± 0,4 ^a	16,6 ± 0,6 ^f
60	81,8 ± 0,2 ^g	17,5 ± 0,1 ^f	0,7 ± 0,3 ^a	18,2 ± 0,2 ^g
70	79,3 ± 0,2 ^h	19,8 ± 0,5 ^g	0,8 ± 0,3 ^a	20,7 ± 0,2 ^h
80	75,7 ± 0,1 ⁱ	23,5 ± 0,0 ^h	0,8 ± 0,3 ^a	24,3 ± 0,1 ⁱ
90	73,6 ± 0,3 ^j	24,6 ± 0,2 ⁱ	1,8 ± 0,3 ^a	26,4 ± 0,3 ^j

* mg/100 mg de aceite

Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

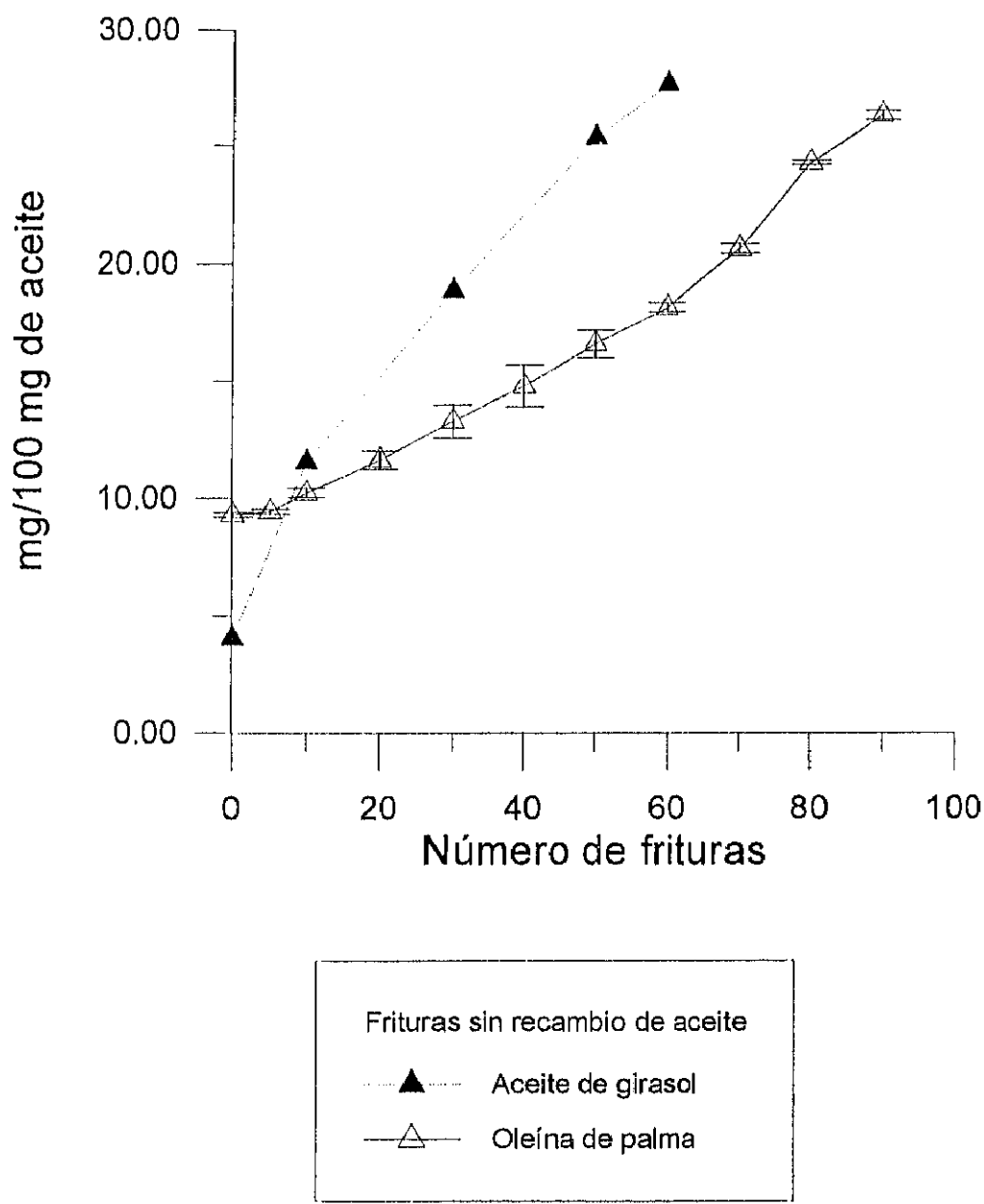
La comparación entre el contenido de triglicéridos polares de la oleína de palma y el del aceite de girasol utilizado en frituras repetidas sin recambio de aceite aparece en la figura 57. Cuando se observan los resultados, llama la atención el elevado contenido en compuestos polares encontrado en la muestra original de oleína de palma que fue de 9,3 mg/100 mg de aceite, en comparación con los 4,05 mg/100 g de aceite del aceite de girasol sin usar. Este hecho ha sido descrito por diferentes autores como Dobarganes y col.(1984a), que encontraron un 8% de compuestos polares en aceite de palma, y como se verá a continuación, se debe al elevado contenido de diglicéridos que presenta la oleína de palma de partida, los cuales cluyen en la fracción de compuestos polares.

En dicha figura se puede observar también que si bien en ambos tipos de grasa culinaria se produjo un incremento en el contenido de compuestos polares durante las sucesivas frituras de patatas, éste fue mucho mayor en el caso del aceite de girasol que, después de 60 frituras, presentó un valor siete veces mayor al de dicha grasa de partida, mientras que la oleína de palma, después del mismo número de frituras, únicamente duplicó su contenido de compuestos polares respecto al original. Esto indica una mayor resistencia a la alteración producida durante las frituras de la oleína de palma frente al aceite de girasol. Como consecuencia de este hecho, mientras que el aceite de girasol después de 50 frituras de patatas ya había sobrepasado el valor límite del 25% de compuestos polares establecido por la legislación para desechar una grasa de fritura, la oleína de palma no alcanzó dicho valor hasta después de 80 frituras de patatas. Según esto, la oleína de palma presenta mucho mayor estabilidad que el aceite de girasol durante frituras repetidas, lo que supone que su vida útil sea mucho mayor.

IV.2.3.2 Determinación de los restos acilo alterados y no alterados.

Esta determinación se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, siguiendo la modificación introducida por Dobarganes y col. (1984a) del método recomendado por la IUPAC (1987b) para la determinación de los compuestos polares. Dicha técnica, permite separar los ésteres metílicos de los ácidos grasos no alterados de los que han sufrido algún tipo de alteración como consecuencia de la fritura.

Figura 57.- Comparación entre el contenido en compuestos polares del aceite de girasol y la oleína de palma utilizados en frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite.



Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 34, en la cual, de igual forma que en la determinación de los compuestos polares, aparecen diferentes columnas que corresponden a los ésteres metílicos no polares, ésteres metílicos polares eluidos, fracción polar retenida y fracción de ésteres metílicos polares totales. Con el término fracción polar retenida, se denomina a la cantidad de ésteres metílicos de ácidos grasos que, debido a su elevada polaridad, no fueron eluidos y permanecieron en la columna. La fracción de ésteres metílicos polares totales, por ello, es la suma de los ésteres metílicos polares eluidos más la fracción retenida en columna. Debido a la poca magnitud de la fracción polar retenida en columna, cuando hablemos de ésteres metílicos polares nos referiremos a la fracción polar total.

Una vez separadas las diferentes fracciones mediante cromatografía en columna, se comprobó la eficacia de separación mediante cromatografía en capa fina, observándose en todos los casos, manchas perfectamente separadas y sin contaminación.

Los resultados presentados en la tabla 34, indican que se produjo un descenso en el contenido de ésteres metílicos no alterados debido a las frituras, el cual fue significativo desde la fritura 20. Así, se pasó de $97,4 \pm 0,1\%$ de ésteres metílicos no alterados en la oleína de partida hasta $91,2 \pm 0,1\%$ de los mismos después de la realización de 90 frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite. La fracción de ésteres metílicos polares, por su parte, se incrementó significativamente desde la vigésima fritura, pasando de $2,6 \pm 0,1\%$ en la oleína de palma sin usar, a $8,8 \pm 0,1\%$ en dicha grasa después de ser utilizada para realizar 90 frituras repetidas de patatas.

Estos resultados indican que, después de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite, el contenido de ésteres metílicos no alterados de la oleína de palma descendió en un 6,5% aproximadamente respecto a la muestra inicial. Sin embargo, Dobarganes y col. (1984a), trabajando en condiciones más drásticas de calentamiento, -aceite de palma calentado durante 100 horas a 195°C -, registraron un descenso del $\approx 28,5\%$ en dicha fracción respecto a la muestra de partida.

Resultados análogos a los del presente estudio han sido descritos por distintos autores utilizando diferentes grasas culinarias como: aceite de oliva (Hernández y col., 1989) y aceite de girasol, procedente del baño de la freidora (Garrido-Polonio, 1991) o extraído de patatas fritas en dicho aceite (Arroyo, 1991).

Tabla 34. Variación de las diferentes fracciones de ésteres metílicos (no polar, polar eluído, polar retenido y polar total (polar eluído + polar retenido)) de la oleína de palma a lo largo de 90 frituras de patatas.

Nº de fritura	Composición*			
	Fracción no polar	Fracción polar eluída	Fracción polar retenida	Fracción polar total
0	97,4 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a
5	97,2 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,1 ^a
10	97,1 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^a
20	96,7 ± 0,1 ^b	2,7 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,1 ^b
30	96,4 ± 0,1 ^c	2,9 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^c
40	96,0 ± 0,2 ^d	3,2 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,1 ^a	4,0 ± 0,2 ^d
50	94,9 ± 0,2 ^e	4,2 ± 0,2 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,2 ^e
60	94,0 ± 0,2 ^f	5,2 ± 0,3 ^d	0,8 ± 0,1 ^a	6,0 ± 0,2 ^f
70	93,2 ± 0,1 ^g	6,1 ± 0,3 ^e	0,7 ± 0,2 ^a	6,8 ± 0,1 ^g
80	92,1 ± 0,2 ^h	7,1 ± 0,3 ^f	0,8 ± 0,1 ^a	8,0 ± 0,2 ^h
90	91,2 ± 0,1 ⁱ	8,0 ± 0,2 ^g	0,9 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,1 ⁱ

* mg/100 mg de ésteres metílicos totales

Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

La comparación entre las determinaciones de triglicéridos y ésteres metílicos polares en la oleína de palma empleada en frituras repetidas de patatas aparece en la figura 58. En dicha figura se puede comprobar que dichos métodos presentaron una buena correlación lineal como se refleja en el alto valor del coeficiente de correlación encontrado ($r = 0,995$), siendo la ecuación de la recta $y = -0,923 + 3,671 x$. Según dicha ecuación, en la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras de patatas, el valor de 25% de compuestos polares, límite establecido por la legislación para desear una grasa de fritura, se correspondería con un 8,26% de ésteres metílicos polares.

El menor valor obtenido para la fracción polar de los ésteres metílicos de las diferentes frituras, con respecto al valor obtenido con el método de los triglicéridos, estaría justificado por la especificidad del método, que valora exclusivamente los ácidos grasos alterados del triglicérido, y no la totalidad del mismo (Pérez-Camino, 1986; Dobarganes y col., 1984a).

Este hecho supone que la determinación de los ésteres metílicos alterados sea considerado por diferentes autores (Ancín Azpilicueta y Martínez Ramírez, 1991) como el parámetro que mejor cuantifica la degradación de los aceites sometidos a fritura.

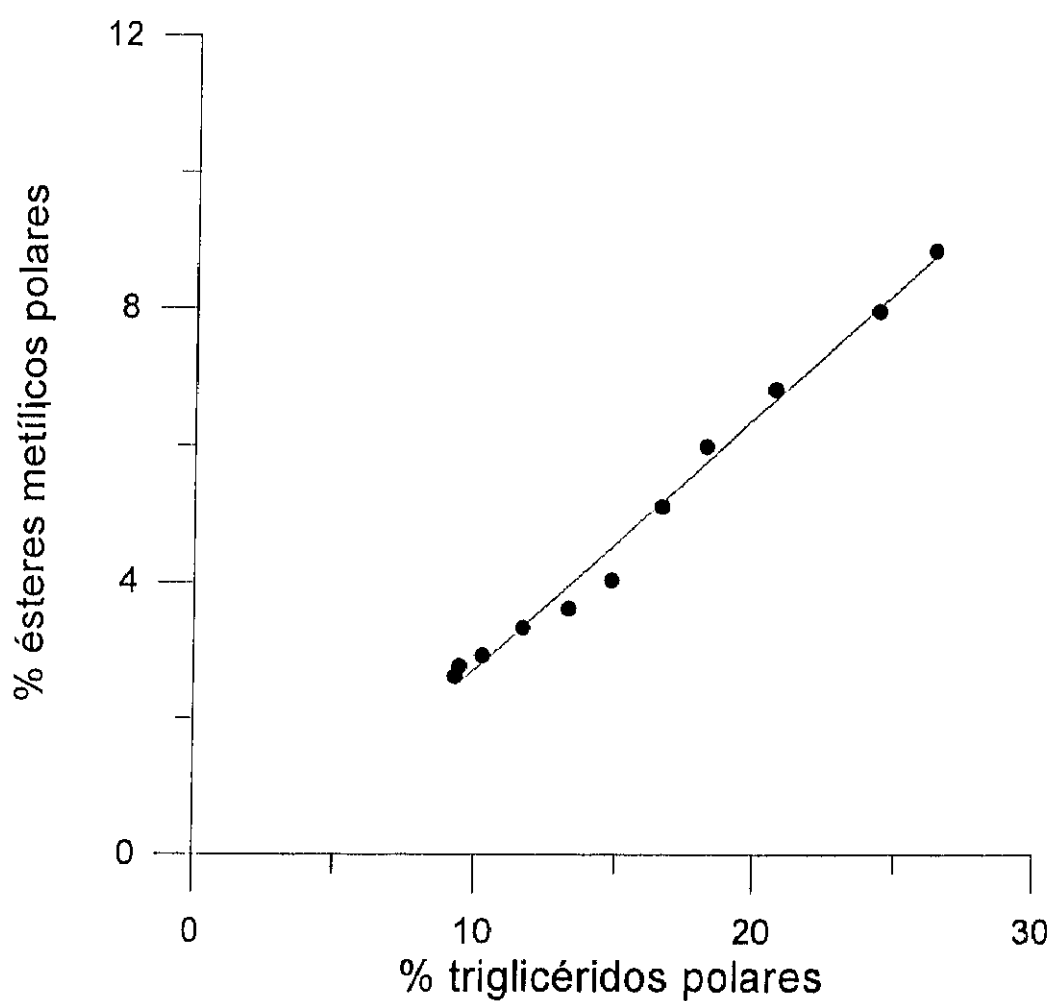
Los resultados obtenidos en este estudio indican que ambos métodos son válidos para cuantificar la alteración producida en el aceite de palma como consecuencia de la fritura de patatas sin recambio de aceite.

IV.2.3.3 Determinación de la composición en ácidos grasos.

En la tabla 35 se muestra la composición porcentual en ácidos grasos de la oleína de palma sin usar y después de sucesivas frituras de patatas sin renovación de aceite.

La composición en ácidos grasos que presentó la oleína de palma de partida es similar a la descrita por diferentes autores entre los que se encuentran Dobarganes y Pérez-Camino (1988a), Dobarganes y col. (1984a), MacFarlane y col. (1984) y Yoon y col. (1987).

Figura 58.- Estudio comparativo de las fracciones polares de triglicéridos de ésteres metílicos de la oleína de palma utilizada en frituras de patatas sin recambio de aceite.



$$y = -0,923 + 3,671 x \quad (r=0,995)$$

Tabla 35. Evolución de la **composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios** de la oleína de palma a lo largo de 90 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Ácidos grasos mayoritarios*				
	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)
0	1,10±0,04 ^a	38,6±0,4 ^a	4,02±0,01 ^a	44,9±0,2 ^a	10,3±0,4 ^a
5	1,09±0,05 ^a	37,9±0,6 ^a	3,91±0,08 ^a	44,5±0,8 ^b	10,4±0,3 ^a
10	1,10±0,04 ^a	38,0±0,7 ^a	3,94±0,07 ^a	44,6±0,2 ^a	10,3±0,1 ^a
20	1,04±0,05 ^a	37,6±1,1 ^a	3,86±0,10 ^a	44,5±0,4 ^a	10,0±0,2 ^a
30	1,11±0,03 ^a	38,2±0,5 ^a	4,01±0,04 ^a	44,9±0,4 ^a	10,0±0,1 ^a
40	1,13±0,05 ^a	38,1±0,3 ^a	3,95±0,06 ^a	44,4±0,2 ^a	9,6±0,14 ^b
50	1,15±0,03 ^a	38,6±0,4 ^a	4,03±0,04 ^a	44,6±0,1 ^a	9,4±0,06 ^b
60	1,11±0,05 ^a	38,8±0,4 ^a	4,03±0,09 ^a	44,6±0,4 ^a	9,1±0,15 ^b
70	1,12±0,04 ^a	39,3±0,2 ^a	4,10±0,08 ^a	44,5±0,4 ^a	8,7±0,16 ^c
80	1,15±0,02 ^a	40,0±0,5 ^a	4,16±0,10 ^a	44,3±0,5 ^a	8,1±0,14 ^d
90	1,14±0,07 ^a	39,7±0,5 ^a	4,12±0,15 ^a	44,4±0,5 ^a	7,8±0,21 ^e

* mg/100 mg de ácidos grasos totales.

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Los resultados obtenidos indican que como consecuencia de las frituras realizadas, únicamente se produjeron variaciones significativas en el porcentaje de ácido linoleico, que descendió de $10,3 \pm 0,4\%$ en la oleína original a $7,8 \pm 0,2\%$ después de su empleo en 90 frituras de patatas sin renovación de aceite. La desaparición de ácido linoleico también se

pone de manifiesto cuando se establecieron cocientes entre los porcentajes de los diferentes ácidos grasos respecto al ácido palmítico, los cuales aparecen en la tabla 36.

Tabla 36. Cocientes establecidos entre el porcentaje de los ácidos grasos esteárico oleico y linoleico respecto al del palmítico en la oleína de palma utilizada en frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite.**

Nº de fritura	C18:0/C16:0	C18:1/C16:0	C18:2/C16:0
0	0,10	1,16	0,27
40	0,10	1,16	0,25
90	0,10	1,12	0,20

En dicha tabla se puede observar como el cociente C18:0/C16:0 permaneció constante durante las frituras, ya que los ácidos grasos saturados no se modificaron como consecuencia de dicho proceso culinario. Sin embargo, los cocientes C18:1/C16:0 y sobre todo C18:2/C16:0, disminuyeron como consecuencia de las frituras ya que la degradación de las grasas se produce a nivel de los ácidos grasos insaturados (Gere, 1982; Stevenson y col.,1984).

El análisis cuantitativo de la composición en ácidos grasos de las diferentes muestras de oleína de palma, se realizó aplicando la fórmula indicada en el apartado III.2.3.2.2.3 de Materiales y Métodos, la cual fue propuesta por Dobarganes y Pérez-Camino (1988a).

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de los ácidos grasos de la oleína de palma aparecen en la tabla 37.

Tabla 37. Evolución de la **composición en ácidos grasos mayoritarios** de una oleína de palma a lo largo de 90 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Ácidos grasos mayoritarios*				
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
0	1,07±0,04 ^a	37,6±0,4 ^a	3,92±0,01 ^a	43,7±0,2 ^a	10,0±0,4 ^a
5	1,06±0,05 ^a	36,9±0,5 ^a	3,81±0,08 ^a	43,3±0,9 ^b	10,2±0,3 ^a
10	1,07±0,04 ^a	36,9±0,7 ^a	3,82±0,06 ^a	43,3±0,2 ^a	10,0±0,1 ^a
20	1,00±0,04 ^a	36,4±1,0 ^a	3,73±0,10 ^a	43,0±0,4 ^a	9,69±0,19 ^a
30	1,07±0,03 ^a	36,8±0,4 ^a	3,86±0,03 ^a	43,3±0,4 ^a	9,67±0,09 ^a
40	1,08±0,05 ^a	36,6±0,2 ^a	3,79±0,05 ^a	42,6±0,1 ^a	9,19±0,11 ^a
50	1,10±0,03 ^a	36,7±0,2 ^a	3,83±0,02 ^a	42,5±0,3 ^a	8,90±0,07 ^b
60	1,07±0,02 ^a	36,8±0,3 ^a	3,87±0,06 ^a	42,2±0,1 ^a	8,54±0,15 ^c
70	1,05±0,03 ^a	36,6±0,2 ^a	3,82±0,07 ^a	41,5±0,3 ^b	8,15±0,14 ^d
80	1,06±0,02 ^a	36,8±0,5 ^a	3,83±0,10 ^a	40,8±0,5 ^c	7,49±0,14 ^e
90	1,05±0,06 ^a	36,3±0,6 ^a	3,76±0,15 ^a	40,6±0,6 ^c	7,15±0,22 ^f

* mg/100 mg de aceite.

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

El análisis cuantitativo de los diferentes ácidos grasos de la oleína de palma confirmó lo dicho anteriormente acerca de que únicamente se produjeron variaciones en el contenido en ácidos grasos insaturados, especialmente en el ácido linoleico que fue de $10,0 \pm 0,4$ mg/100 mg de aceite en la oleína sin usar y $7,15 \pm 0,22$ mg/100 mg de aceite después de

90 frituras de patatas. Sin embargo, el ácido oleico pasó de $43,7 \pm 0,2$ a $40,6 \pm 0,6$ mg/100 mg de aceite desde la muestra original a la procedente de 90 frituras repetidas de patatas. Según estos datos, el 28,2% del ácido linoleico desapareció como consecuencia de las frituras, mientras que en el caso del ácido oleico, esta desaparición fue del 7%.

Los resultados encontrados en este estudio son análogos a los descritos por diferentes autores entre los que se encuentran Cuesta y col. (1991b), Figueroa (1984), Hernández (1989), Miller y White (1988), Thompson y Aust (1983) para distintos aceites como consecuencia de su fritura o calentamiento.

IV.2.4 DETERMINACION DE PRODUCTOS DE ALTERACION TERMOOXIDATIVA E HIDROLITICA.

Dicha determinación se realizó mediante el análisis de la fracción de compuestos polares mediante la técnica de HPSEC. En la figura 59 aparecen los cromatogramas obtenidos procedentes de la oleína de palma sin usar, y empleada en la realización de 40 y 90 frituras de patatas respectivamente. En cada cromatograma aparecen una serie de picos correspondientes a las diferentes fracciones obtenidas que fueron las siguientes: polímeros de triglicéridos (1), dímeros de triglicéridos (2), triglicéridos oxidados (3), diglicéridos (4), monoglicéridos (5) y ácidos grasos libres (6).

Como se ha comentado, los polímeros y dímeros de triglicéridos, y los triglicéridos oxidados son productos característicos de la alteración termooxidativa de las grasas, mientras que los diglicéridos, monoglicéridos y los ácidos grasos libres se forman como consecuencia de la alteración hidrolítica (Dobarganes y col., 1988).

En la tabla 38 aparece la distribución de las diferentes fracciones que constituyen el componente polar de la oleína de palma sin usar y después de utilizarse en sucesivas frituras de patatas sin renovación de aceite.

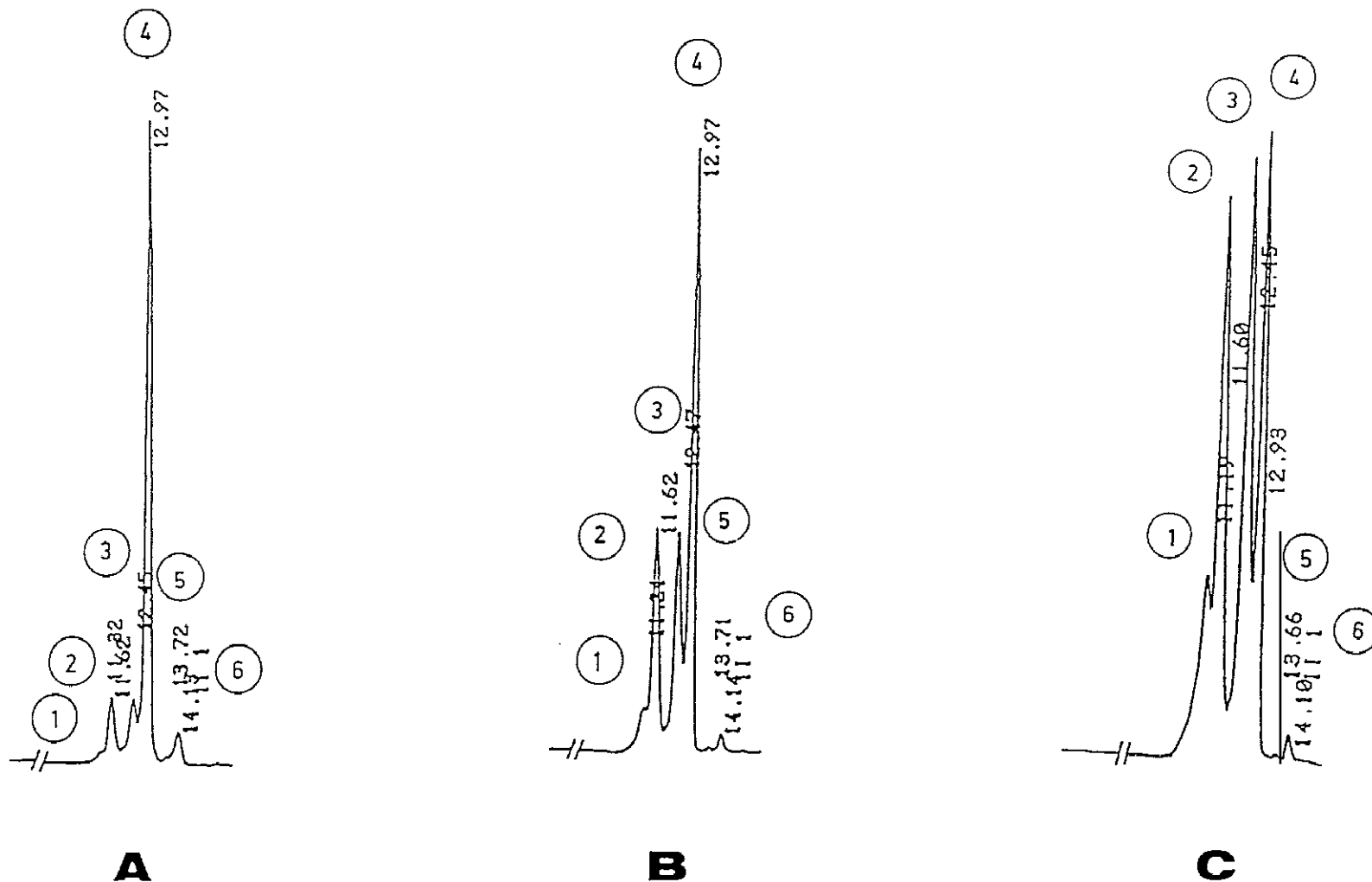


Figura 59.- Cromatogramas de HPSEC de las fracciones polares de la oleína de palma sin usar (A), y después de 40 (B) y 90 (C) frituras de patatas sin recambio de aceite.

Tabla 38. Evolución de la composición porcentual de los compuestos específicos de la alteración de la oleína de palma utilizada en 90 frituras sucesivas de patatas sin recambio de aceite.

Nº de fritura	Alteración termooxidativa*			Alteración hidrolítica*		
	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados*	DG	MG	AGL
0	1,27±0,1 ^a	10,99±0,2 ^a	12,03±2,3 ^a	72,72±2,2 ^a	0,47±0,1 ^a	2,52±1,5 ^a
5	1,91±0,2 ^b	12,32±0,7 ^b	15,18±0,3 ^b	68,39±1,1 ^b	0,62±0,0 ^b	1,58±0,1 ^b
10	2,32±0,7 ^b	14,46±1,0 ^c	17,15±0,7 ^c	64,18±2,2 ^c	0,31±0,1 ^c	1,59±0,1 ^b
20	3,31±0,1 ^c	19,55±0,6 ^d	21,21±0,7 ^d	54,38±1,4 ^d	0,22±0,0 ^d	1,34±0,3 ^b
30	4,38±0,5 ^d	22,10±1,3 ^e	24,05±0,6 ^e	47,92±1,7 ^e	0,30±0,0 ^e	1,24±0,0 ^b
40	5,89±0,7 ^e	24,48±1,2 ^f	25,84±0,5 ^f	42,47±2,3 ^f	0,21±0,0 ^d	1,10±0,0 ^b
50	7,46±0,1 ^f	26,49±0,2 ^g	27,54±0,3 ^g	37,24±0,2 ^g	0,24±0,0 ^d	1,02±0,0 ^b
60	8,61±0,1 ^g	27,53±0,1 ^h	28,91±0,3 ^g	33,72±0,2 ^h	0,22±0,0 ^d	1,01±0,0 ^b
70	10,03±0,2 ^h	28,57±0,1 ⁱ	30,51±0,2 ^h	29,73±0,0 ⁱ	0,19±0,0 ^d	0,96±0,0 ^b
80	12,92±0,3 ⁱ	29,85±0,0 ^j	31,29±0,5 ^h	24,96±0,3 ^j	0,16±0,0 ^d	0,81±0,1 ^b
90	13,93±0,0 ^j	30,05±0,1 ^j	31,59±0,1 ^h	23,46±0,2 ^j	0,16±0,0 ^d	0,81±0,0 ^b

* : expresados en mg/100 mg de compuestos polares y representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

TG: Triglicéridos ; DG: Diglicéridos ; MG: Monoglicéridos; AGL: Acidos grasos libres ; N: nº de determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Como se puede observar en la tabla 38, llama la atención la gran cantidad de diglicéridos existentes en la oleína de palma sin usar, que implica que dichos compuestos

sean los componentes mayoritarios de la fracción polar y en la cual representa el 72,7% de dicha fracción. Este hecho, ya comentado en el apartado IV.2.3.1 de determinación de compuestos polares, es la causa por la que la oleína de palma presente un elevado contenido en compuestos polares ya en las muestras de partida, el cual fue en nuestro caso de 9,3%.

Por otro lado, la fracción polar de la oleína de palma, al aumentar el número de frituras, se fue enriqueciendo significativamente en compuestos específicos de la alteración termooxidativa. De esta forma, los polímeros de triglicéridos que representaban el $1,3 \pm 0,1\%$ de la fracción polar de la oleína de palma de partida, pasaron a un $13,9 \pm 0,0\%$ cuando dicha grasa se utilizó 90 veces para freír patatas. En cuanto a los polímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados que constituían respectivamente el $11,0 \pm 0,2\%$ y $12,0 \pm 2,3\%$ de la fracción polar de la oleína de palma sin usar, después de 90 frituras de patatas se incrementó su proporción dentro de la fracción polar al $30,1 \pm 0,1\%$ y $31,6 \pm 0,1\%$ de dicha fracción, respectivamente (tabla 38).

Los diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, compuestos característicos de la alteración hidrolítica, que representaban el $72,7 \pm 2,2\%$, $0,5 \pm 0,1\%$ y $2,5 \pm 1,5\%$ respectivamente de la fracción polar de la oleína de palma sin usar, experimentaron todos ellos un descenso en su composición porcentual respecto a la fracción polar después de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite, pasando a constituir el $23,5 \pm 0,2\%$, $0,2 \pm 0,0\%$ y $0,8 \pm 0,0\%$ de dicha fracción respectivamente (tabla 38).

Cuando estos resultados se comparan con la composición porcentual de los compuestos específicos de la alteración del aceite de girasol empleado en frituras sucesivas de patatas sin renovación de aceite (tabla 22), se puede observar que en éste último la fracción polar únicamente se enriqueció en oligómeros, especialmente polímeros de triglicéridos, ya que los dímeros se estabilizaron a partir de la fritura 30. Sin embargo, la fracción polar de la oleína de palma, se enriqueció en todos los compuestos específicos de la alteración termooxidativa (polímeros y dímeros de triglicéridos, y triglicéridos oxidados), los cuales aumentaron porcentualmente de forma significativa dentro del componente polar.

En cuanto a la distribución de los compuestos alterados en la oleína de palma sin usar y después de diferentes frituras realizadas sin recambio de aceite, los resultados aparecen en la tabla 39.

Tabla 39. Evolución del contenido en los **compuestos específicos de la alteración** de la oleína de palma utilizada en 90 frituras sucesivas de patatas **sin recambio de aceite.**

Nº de fritura	Alteración termooxidativa*			Alteración hidrolítica*		
	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados	DG	MG	AGL
0	0,1±0,0 ^a	1,0±0,3 ^a	1,1±0,2 ^a	6,7±0,2 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,1 ^a
5	0,2±0,0 ^a	1,2±0,1 ^a	1,4±0,0 ^b	6,5±0,1 ^a	0,06±0,0 ^b	0,2±0,0 ^a
10	0,2±0,1 ^a	1,5±0,1 ^b	1,8±0,1 ^c	6,6±0,3 ^a	0,03±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
20	0,4±0,0 ^a	2,3±0,1 ^c	2,5±0,2 ^d	6,3±0,1 ^a	0,03±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
30	0,6±0,1 ^a	2,9±0,3 ^d	3,2±0,2 ^e	6,4±0,1 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
40	0,9±0,1 ^a	3,6±0,4 ^e	3,8±0,3 ^f	6,3±0,2 ^a	0,03±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
50	1,2±0,1 ^a	4,4±0,2 ^f	4,6±0,1 ^g	6,2±0,2 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
60	1,6±0,0 ^b	5,0±0,1 ^g	5,3±0,1 ^h	6,1±0,1 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
70	2,1±0,1 ^c	5,9±0,1 ^h	6,3±0,1 ⁱ	6,2±0,1 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
80	3,2±0,1 ^d	7,3±0,0 ⁱ	7,6±0,1 ^j	6,1±0,0 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
90	3,7±0,0 ^e	7,9±0,1 ^j	8,3±0,1 ^k	6,2±0,1 ^a	0,04±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a

Para identificación de abreviaturas ver tabla 38.

* : expresados en mg/100 mg de aceite y representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Los valores para la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA de muestras repetidas y test de Newman-Keuls para múltiples comparaciones).

Los resultados que aparecen en la tabla 39 indican que la oleína de palma después de sucesivas frituras de patatas fue aumentando su contenido en productos alterados. Este aumento se produjo exclusivamente en los compuestos de alteración termooxidativa (polímeros y dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados), mientras que los compuestos

Resultados y Discusión

de alteración hidrolítica no modificaron su contenido (diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres). Así, en cuanto a los polímeros y dímeros de triglicéridos, y los triglicéridos oxidados pasaron de $0,1 \pm 0,0$; $1,0 \pm 0,3$ y $1,1 \pm 0,2$ mg/100 mg de aceite en la oleína de palma sin usar, a $3,7 \pm 0,0$; $7,9 \pm 0,1$ y $8,3 \pm 0,1$ mg/100 mg de aceite después de 90 frituras repetidas de patatas sin renovación de aceite.

El incremento de los polímeros de triglicéridos con el número de la frituras, fue más marcado después de la fritura 50, siendo entonces significativas las diferencias encontradas en la cantidad de estos compuestos para las diferentes muestras analizadas. Esto estaría de acuerdo con lo indicado por diferentes autores acerca de la polimerización progresiva que tiene lugar en los aceites cuando se alteran, bien sea por fritura o por calentamiento (Combe y col., 1981; Cuesta y col., 1993; Hara y col., 1989; Kuprancyez y col., 1986; Nawar, 1984; Perrin y col., 1984; Sánchez-Muniz y col., 1993a; Sebedio y col., 1987; White y Wang, 1986).

Los compuestos específicos de la alteración hidrolítica, como se ha dicho anteriormente, no se modificaron, siendo la cantidad de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres a lo largo de las diferentes frituras realizadas, del orden de 6,5 ; 0,04 y 0,2 mg/100 mg de aceite respectivamente (tabla 39).

Esto implica que, cuando la oleína de palma se utiliza para realizar frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite, tiene lugar un proceso de alteración termooxidativa en mucha mayor proporción que un proceso hidrolítico. Este hecho se pone de manifiesto, principalmente, cuando se establecen cocientes entre los diferentes grupos de compuestos presentes en la oleína de palma de partida y después de sucesivas frituras, los cuales aparecen en la tabla 40. Según dicha tabla, la relación entre los compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica en la oleína de palma a lo largo de las diferentes frituras, pasó de un valor de 0,32 en la muestra de partida a 3,10 después de la realización de 90 frituras de patatas sin recambio de aceite.

Tabla 40. Cocientes establecidos entre la cantidad de triglicéridos no polares y diferentes grupos de compuestos alterados, y entre los compuestos de alteración termooxidativa e hidrolítica en la oleína de palma sin usar y empleada en diferentes frituras de patatas sin recambio de aceite.

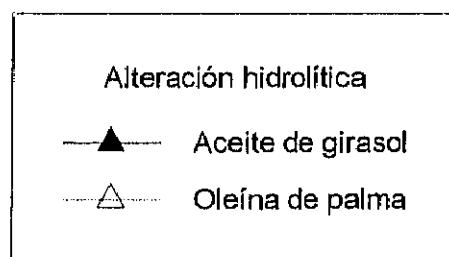
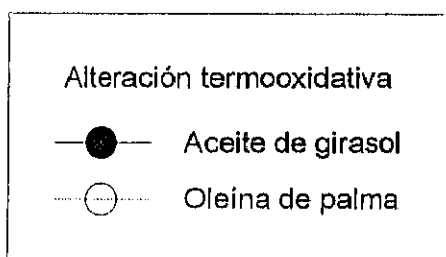
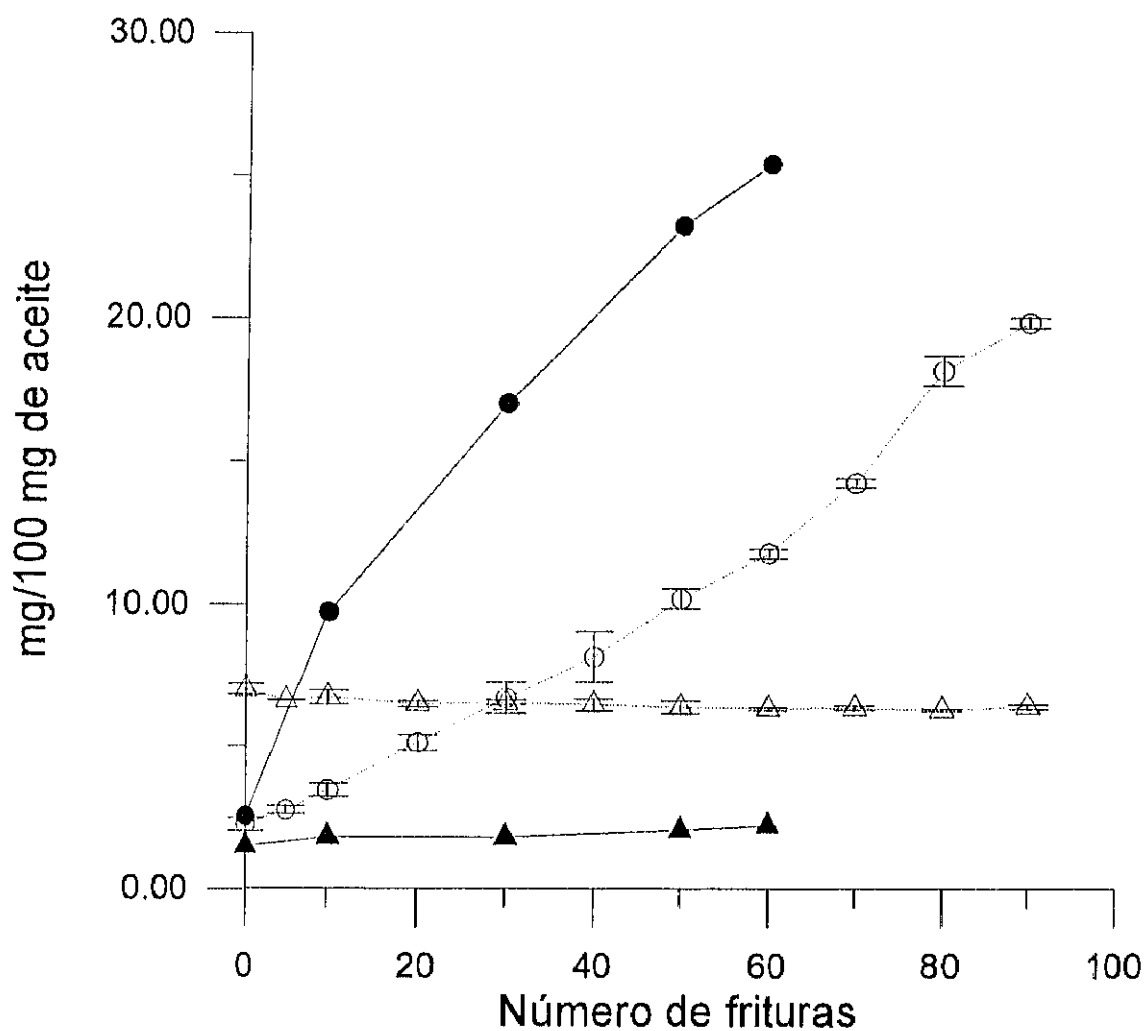
Cocientes	Número de frituras		
	0	40	90
TG no polares/compuestos polares	9,79	5,75	2,79
TG no polares/alteración termooxidativa	40,15	10,21	3,70
TG no polares/alteración hidrolítica	13,02	13,17	11,45
Alteración termoox./Alteración hidrolítica	0,32	1,29	3,10

En la figura 60, se representa gráficamente la comparación entre la alteración termooxidativa e hidrolítica que tiene lugar en la oleína de palma y en el aceite de girasol después de sucesivas frituras de patatas sin recambio de aceite.

Respecto a la alteración termooxidativa, de forma paralela a lo que sucedía cuando se comparaba el contenido en compuestos polares de un aceite y otro, se produjo un incremento en ambos casos al aumentar el número de frituras, sin embargo, dicho incremento fue mucho más marcado en el aceite de girasol que en la oleína de palma. Según esto, la oleína de palma es una grasa mucho más estable a la oxidación térmica que el aceite de girasol, lo cual es esperable, ya que la susceptibilidad de una grasa a la alteración termooxidativa depende fundamentalmente de su contenido en ácidos grasos insaturados (Gere, 1982; Permanyer y Boatella, 1977; Guillaumin, 1988; Stevenson y col., 1984) y, como es sabido y ha sido corroborado en esta Memoria, la oleína de palma presenta un mayor contenido en ácidos grasos saturados que el aceite de girasol (tablas 14, 15, 35 y 37).

Respecto a la alteración hidrolítica, como se puede observar en la figura 60, tanto en la oleína de palma como en el aceite de girasol, no se modificó su contenido en productos de alteración hidrolítica a lo largo de las diferentes frituras realizadas. Sin embargo, como se puede apreciar en dicha figura, el contenido en dichos compuestos es muy diferente entre

Figura 60.- Comparación entre la alteración termooxidativa e hidrolítica del aceite de girasol y la oleína de palma utilizados en frituras repetidas de patatas sin recambio de aceite.



una grasa y otra, lo cual se debe, como se ha podido comprobar tras la cuantificación de cada una de las diferentes fracciones existentes en dicha grasa, al elevado contenido de diglicéridos que posee la oleína de palma de partida, que como ya ha sido comentado, son los responsables del elevado contenido en compuestos polares que presentó la oleína de palma sin usar.

IV.2.4.1 Estudio del factor de respuesta de los componentes polares de la oleína de palma.

De la pendiente de la recta de calibrado obtenida a partir de las muestras de fracciones polares de la oleína de palma ([5]), se pudo obtener el factor de respuesta relativo de dichas mezclas complejas, respecto al de los triglicéridos. Dicho factor de respuesta relativo fue 0,93, valor que se encuentra dentro del intervalo de factores de respuesta encontrados por nosotros para los diferentes patrones estudiados.

Pérez-Camino y col. (1990) haciendo el mismo estudio en aceites de girasol y oliva, obtuvieron resultados semejantes.

Nuevamente, y teniendo en cuenta lo comentado anteriormente sobre la bondad de los ajustes realizados y la similitud de las pendientes obtenidas, afirmamos que el detector de índice de refracción utilizado, en nuestras condiciones experimentales, detecta y cuantifica de manera equivalente los diferentes componentes presentes en las fracciones alteradas de los aceites utilizados en fritura.

IV.2.6 CORRELACIONES ENTRE LAS DIFERENTES DETERMINACIONES REALIZADAS.

A continuación se comentarán las correlaciones existentes entre diferentes componentes de alteración estudiados en la oleína de palma utilizada en la fritura de patatas de forma discontinua.

Como ya se comentó en los apartados IV.2.3 y IV.2.4 en la oleína de palma utilizada durante 90 frituras de patatas tiende a incrementarse el contenido en compuestos polares

(tabla 33) y de compuestos de polimerización y oxidación, tales como polímeros, dímeros y triglicéridos oxidados (tabla 39). También se observa una mayor relevancia de la alteración termooxidativa frente a la alteración hidrolítica (tabla 39).

En la tabla 41 aparecen las correlaciones más destacables entre los diferentes compuestos determinados. Llama sobre todo la atención las correlaciones positivas y muy elevadas encontradas (todas $p < 0,001$) entre los compuestos polares y los polímeros de triglicéridos ($r = 0,9878$), dímeros de triglicéridos ($r = 0,9977$) y triglicéridos oxidados ($r = 0,9976$). Destaca, a su vez, que los compuestos polares y la alteración termooxidativa en la oleína de palma sean totalmente superponibles ($r = 0,9992$).

Resultados similares ya fueron comentados para el aceite de girasol en ambas modalidades de fritura (apartado IV.1.6), y por Garrido-Polonio (1991) y Arroyo (1991) en 15 frituras de patatas en aceite de girasol sin renovación de aceite.

También, como en los estudios con aceite de girasol, resaltan las correlaciones bajas y no significativas ($r = 0,2416$) de los ácidos grasos libres con el componente polar total.

La correlación negativa entre el contenido de diglicéridos y los compuestos polares (tabla 41) ($r = -0,6814$; $p < 0,001$) se explica dada la disminución de los diglicéridos con el número de frituras (tabla 39).

Además, en la tabla 41 destaca la correlación negativa muy elevada y significativa ($r = -0,9782$; $p < 0,001$) entre el ácido linoleico y los compuestos polares total.

Como ya se ha comentado la formación de compuestos termooxidados se origina preferentemente a partir de ácidos grasos con mas de dos dobles enlaces (Gere, 1982; Sánchez-Muniz, 1994; Stevenson y col., 1984). Esto explicaría las correlaciones inversas y muy elevadas ($r < -0,97$; $p < 0,001$) entre el porcentaje de ácido linoleico y la concentración de polímeros, dímeros, triglicéridos oxidados y alteración termooxidativa.

La correlación encontrada entre los compuestos polares totales y los ésteres metílicos alterados fue ($r = 0,9950$; $p < 0,001$), lo que implica que la utilización de las dos técnicas para evaluar las modificaciones de la oleína durante frituras repetidas sea equivalente.

Con anterioridad nuestro equipo (Arroyo, 1991, Cuesta y col., 1991; Hernández y col., 1989) encontraron en diferentes estudios con aceite de oliva y girasol correlaciones muy elevadas y significativas entre los compuestos polares y la fracción de ésteres metílicos alterados.

Tabla 41. Correlaciones producto-momento de Pearson

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	1.0000										
B	0.9950 ^a	1.0000									
C	0.9878 ^a	0.9860 ^a	1.0000								
D	0.9977 ^a	0.9839 ^a	0.9765 ^a	1.0000							
E	0.9976 ^a	0.9867 ^a	0.9776 ^a	0.9988 ^a	1.0000						
F	-0.6814 ^a	-0.6880 ^a	-0.6338 ^a	-0.7128 ^a	-0.7209 ^a	1.0000					
G	-0.0277	0.0103	0.0311	-0.0530	-0.0444	0.1222	1.0000				
H	0.2416	0.2537	0.2649	0.2224	0.2149	-0.0205	-0.0388	1.0000			
I	0.9992 ^a	0.9897 ^a	0.9862 ^a	0.9981 ^a	0.9984 ^a	-0.7046 ^a	-0.0326	0.2280	1.0000		
J	-0.6199 ^a	-0.6227 ^a	0.5672 ^b	-0.6552 ^a	-0.6643 ^a	0.9806 ^a	0.1423	0.1724	-0.6455 ^a	1.0000	
K	-0.9782 ^a	-0.9737 ^a	-0.9736 ^a	-0.9732 ^a	-0.9721 ^a	0.6339 ^a	0.0012	-0.2063	-0.9772 ^a	0.5783 ^a	1.0000

^a $p > 0.001$

^b $p > 0.01$

A: compuestos polares; B: ésteres metílicos polares; C: polímeros de triglicéridos; D: dímeros de triglicéridos; E: triglicéridos oxidados; F: diglicéridos; G: monoglicéridos; H: ácidos grasos libres; I: alteración termooxidativa; J: alteración hidrolítica; K: C18:2.

La fracción de ésteres metílicos alterados también correlacionó de forma muy elevada y significativa con los polímeros y dímeros de triglicéridos, triglicéridos oxidados y alteración termooxidativa (todas $r > 0,983$; $p < 0,001$) y de forma inversa y significativa con los diglicéridos y la alteración hidrolítica ($-0,623 < r < -0,688$; $p < 0,001$).

IV.2.5 ANALISIS FACTORIAL EN COMPONENTES PRINCIPALES.

Los resultados obtenidos con los diferentes análisis realizados permiten llegar a establecer agrupamientos de parámetros entre las muestras de estudio.

Tras consultar a la Jefa del Departamento de Estadística de CTI-CSIC, Dña Laura Barrios, se planteó la realización de un análisis factorial con el mismo conjunto de variables, para determinar una serie de factores que explicaran globalmente las variaciones químicas ocurridas en las muestras.

Dicho análisis proporcionó 5 factores principales, siendo la varianza explicada por cada factor: Factor1 = 13,4269; Factor 2 = 2,0846; Factor 3 = 1,4844; Factor 4 = 1,2758 y Factor 5 = 1,0364, que explicaban en conjunto aproximadamente el 100% de la varianza (tabla 42). Dichos factores presentaron unos valores propios que una vez efectuada la rotación y organizados en orden decreciente de la varianza explicada resultaron de 12,876; 2,028; 1,662; y 1,266 respectivamente (tabla 43).

En la tabla 43 figuran los coeficientes de correlación entre los factores rotados y organizados y las variables analizadas. De su estudio se observa:

i) Una participación muy clara y positiva para el Factor 1 de los compuestos polares, de la alteración termooxidativa, de los polímeros de triglicéridos, de los triglicéridos oxidados, de los dímeros de triglicéridos y de los ésteres metílicos, y negativa para el contenido en ácido linoleico de la muestra.

ii) El Factor 2 lo integran los parámetros ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico y ácido esteárico, con una participación mucho mas clara de los tres últimos.

iii) Destacan la alteración hidrolítica y el contenido en diglicéridos como los componentes mayoritarios del 3^{er} Factor.

iv) En el **Factor 4** se encuentran fundamentalmente los monoglicéridos como componente principal.

v) Finalmente, los ácidos grasos serían el componente más participativo del **Factor 5**.

Tabla 43. Análisis factorial. Varianza explicada por cada uno de los factores.

Factor	Varianza explicada	Proporción acumulada de la varianza
1	13,4269	0,6954
2	2,0846	0,8034
3	1,4844	0,8802
4	1,2758	0,9463
5	1,0364	1,0000

Dada el poder discriminante de los primeros factores sobre los últimos, y como resumen de estos puntos, se podría deducir la importancia de la determinación del contenido de polares, de componentes termooxidativos y del ácido linoleico. La determinación de la alteración hidrolítica no tendría casi relevancia. Esto ya ha sido sugerido en múltiples ocasiones por nuestro equipo friendo con diferentes tipos de aceites (Arroyo y col., 1992; Cuesta y col., 1993).

La aplicación del análisis factorial sobre las 30 muestras de aceite estudiadas permite claramente establecer una relación entre el **Factor 1** y la termooxidación de triglicéridos conteniendo principalmente ácido linoleico. Este aspecto ya ha sido expuesto ampliamente en la Introducción y en la Discusión de Resultados.

Dentro del **Factor 2**, como ya se ha indicado, se incluyen algunos ácidos grasos, siendo el de más importancia el ácido oleico. No obstante debemos recordar la menor entidad del Factor 2 respecto al Factor 1.

Este aspecto coincide con lo comentado por diferentes autores sobre la mayor labilidad termooxidativa de los aceites poliinsaturados respecto a los monoinsaturados (Cuesta

y col., 1991; Dobarganes y Pérez-Camino, 1988b; Garrido-Polonio y col., 1994; Gere, 1982; Permanyer y Boatella, 1977; Varela y col., 1988).

Tabla 42. Análisis factorial en componentes principales de los diferentes análisis realizados en la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras de patatas sin renovación de aceite.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Compuestos polares	0,988	0,000	0,000	0,000	0,000
Alteración termooxidativa	0,985	0,000	0,000	0,000	0,000
Polímeros de TG	0,984	0,000	0,000	0,000	0,000
TG oxidados	0,982	0,000	0,000	0,000	0,000
Dímeros de TG	0,981	0,000	0,000	0,000	0,000
C18:2	-0,981	0,000	0,000	0,000	0,000
EM polares	0,980	0,000	0,000	0,000	0,000
C16:0	0,723	0,369	0,000	0,310	0,256
C18:1	-0,320	0,858	0,000	0,000	0,000
C14:0	0,369	0,793	0,000	0,000	0,000
C18:0	0,609	0,640	0,000	0,000	0,269
Alteración hidrolítica	-0,563	0,000	0,749	0,000	0,293
Diglicéridos	-0,620	0,000	0,723	0,000	0,000
Monoglicéridos	0,000	0,000	0,266	0,726	-0,282
AGL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,849
Valor propio	12,876	2,028	1,662	1,477	1,265

Matriz de pesos estadísticos del factor reorganizada (en las columnas aparecen en orden decreciente de la varianza explicada por los factores). Las filas han sido reordenadas de tal forma que para factores sucesivos, los pesos > de 0,500 aparecen primero y los pesos menores de 0,250 han sido reemplazados por cero.

IV.3 LIPASA PANCREATICA *IN VITRO*. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

IV.3.1 SUSTANCIAS PATRON.

Las sustancias patrón empleadas fueron la trioleína y 1,3 dioleína con una garantía de pureza superior al 99%, lo cual fue comprobado mediante HPSEC, por la aparición de un único pico cromatográfico.

La 1-monooleína no pudo ser utilizada como patrón debido a su carácter gelificante (Barbe Rocabert y col., 1990a) que impidió su emulsificación al formar agregados, haciendo imposible por ello su utilización como sustrato en las mismas condiciones que los demás patrones para determinar la actividad lipásica.

La medida de la absorbancia de las diferentes muestras se realizó sobre disoluciones de las mismas en THF. Dichas disoluciones se prepararon mediante agitación mecánica, ya que la sonicación provocó la peroxidación del THF generando productos de oxidación y como consecuencia la aparición de bandas de absorción de dicho disolvente en el intervalo de longitudes de onda estudiado (210-800 nm) como se puede observar en la figura 61.

Los espectros de absorción UV-visible obtenidos para la trioleína y la 1,3 dioleína se muestran a continuación (figuras 62 y 63).

En dichos espectros puede observarse que entre 210 y 800 nm existe una absorción terminal debida a los cromóforos $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ y -COO- con un máximo de absorción a 210 y 210,5 nm para la trioleína y 1,3 dioleína respectivamente. En la presente Memoria estudiaremos la absorción a una longitud de onda de 232 nm que, como bien es sabido, está relacionada con la presencia de dobles enlaces conjugados y de grupos oxidados de la molécula (Gere, 1982; Gutiérrez González-Quijano y Dobarganes, 1988; Peers y Swoboda, 1982; Permanyer y Boatella, 1977).

La absorbancia en esta zona es mínima como se aprecia en los espectros, ya que los compuestos puros carecen de estos cromóforos -CH=CH-CH=CH- . No obstante, y dado que esta es una medida tipo para el estudio de la degradación de aceites, se realizaron curvas de calibrado para la trioleína y 1,3 dioleína relacionando la concentración con la absorbancia a 232 nm.

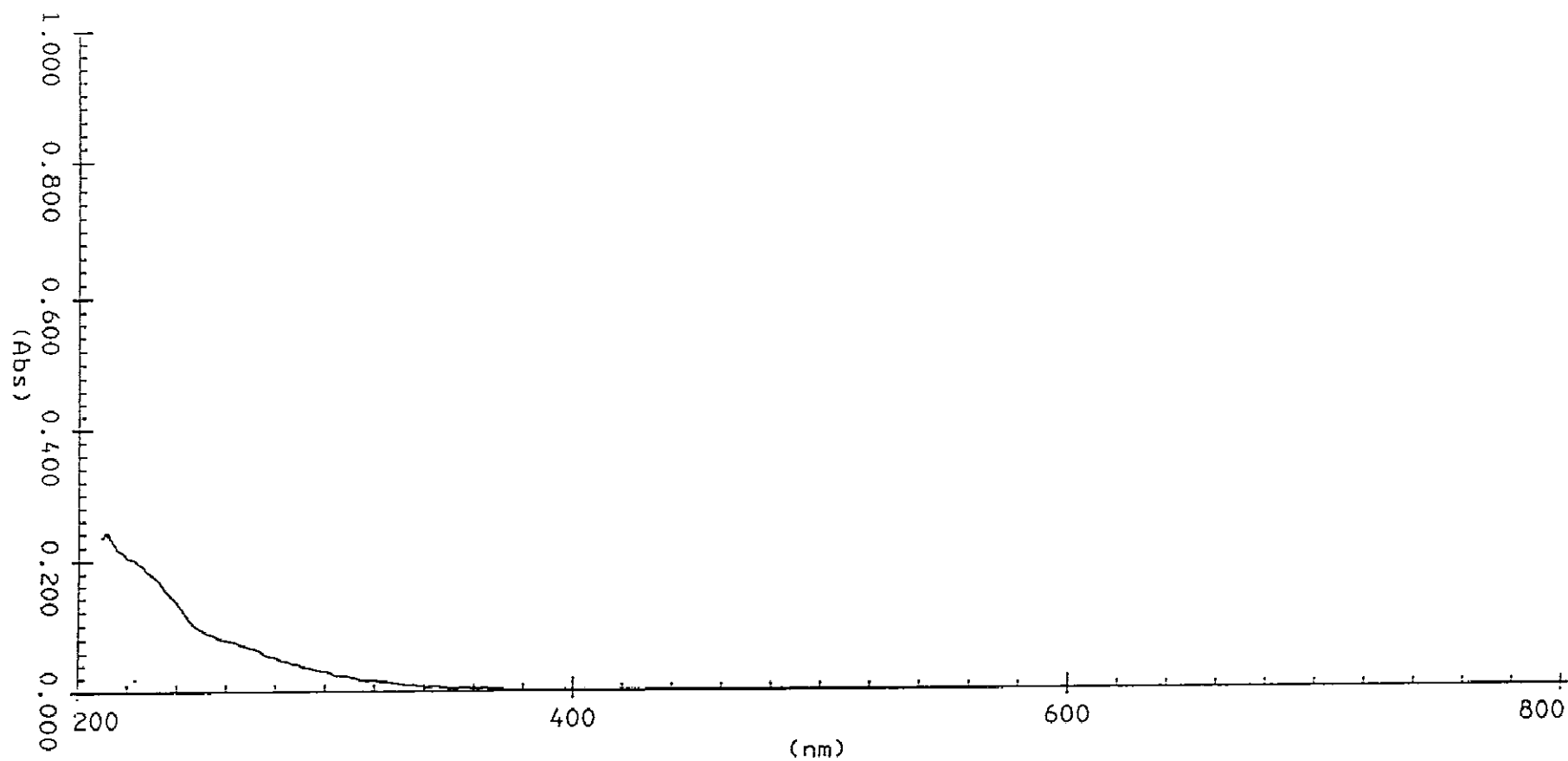


Figura 61.- Espectro de absorción UV-visible de THF después de su sonicación.

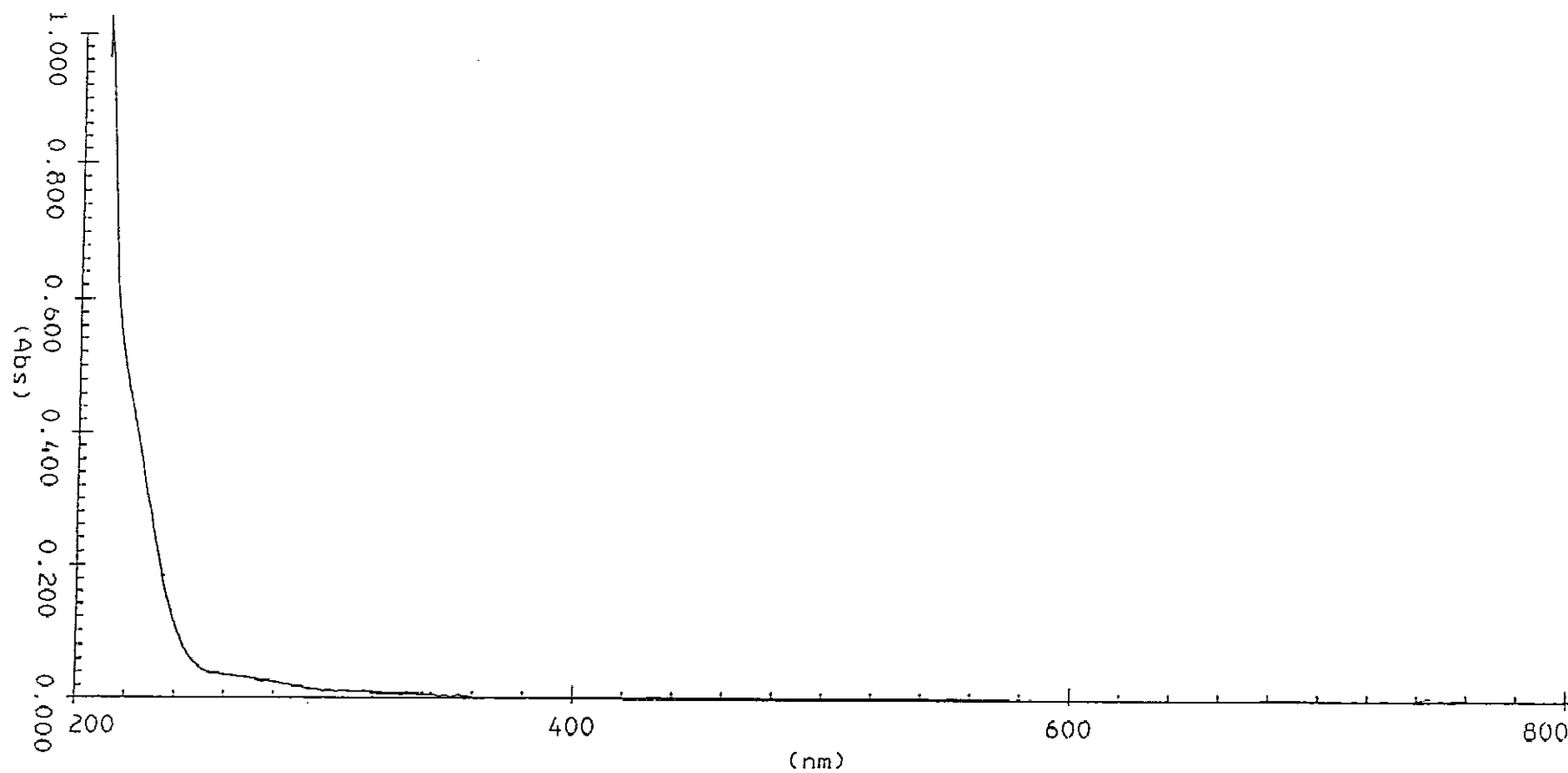


Figura 62.- Espectro de absorción UV-visible de la **trioleína** en disolución de THF.

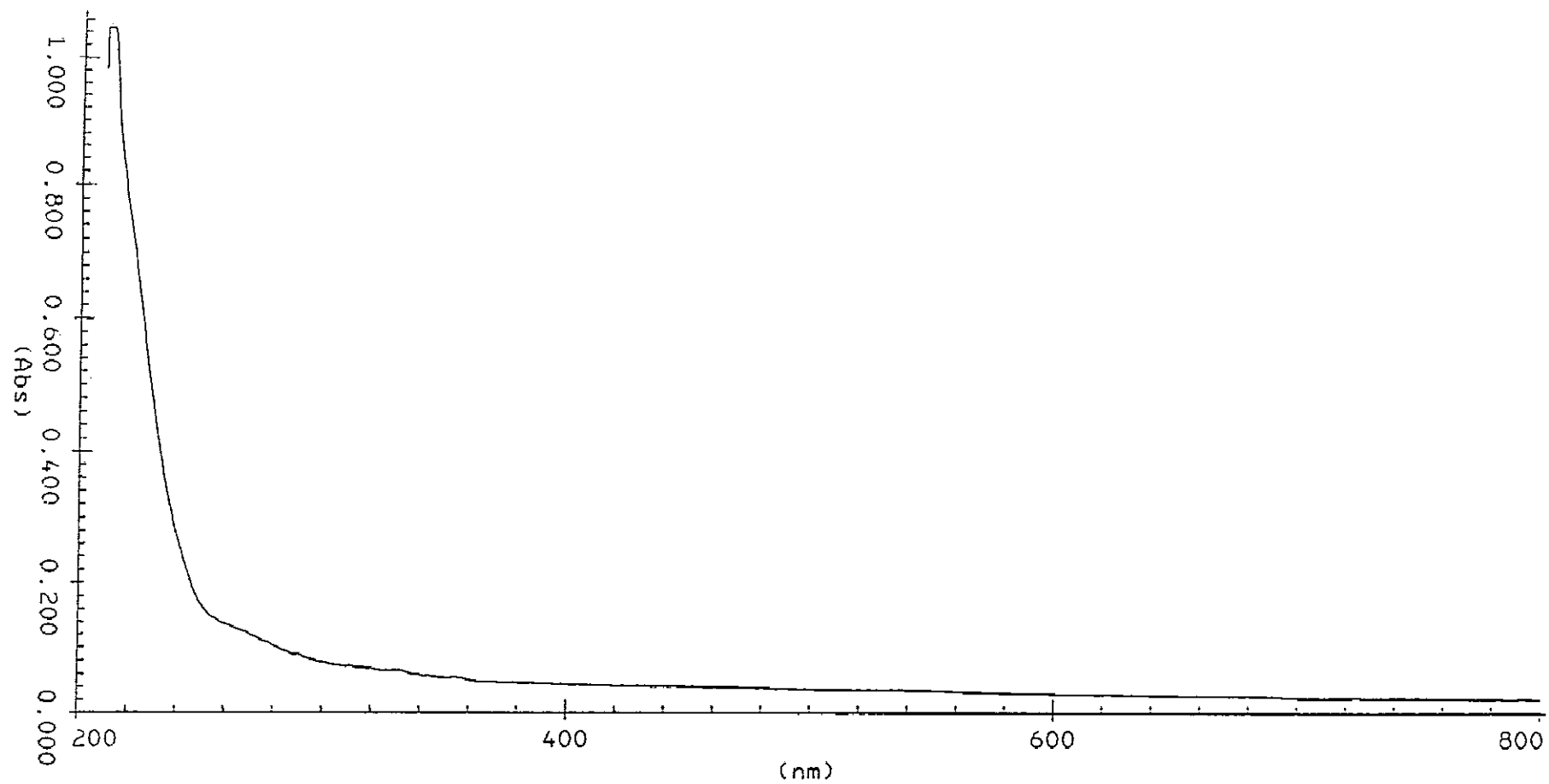


Figura 63.- Espectro de absorción UV-visible de la **1,3 dioleína** en disolución de THF.

Las ecuaciones correspondientes a estas curvas ([6] y [7]) se mostraron en Materiales y Métodos (apartado III.1.3.1). Como es sabido la ecuación de Lambert-Beer, se puede expresar como:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot [\text{CONC}] \quad [9]$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar y b el paso óptico o longitud de la cubeta.

A partir de esta ecuación se puede obtener el coeficiente de extinción molar para las sustancias patrón, que correspondería a la pendiente de las rectas mencionadas anteriormente y que sería $\epsilon = 81,3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para la trioleína y $\epsilon = 64,3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para la 1,3 dioleína.

Los bajísimos valores obtenidos en la cola de la banda son debidos al salto electrónico $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace C=C, que es altamente energético por lo que aparecen a menor longitud de onda ($\lambda < 210 \text{ nm}$). Asimismo, se puede ver que el valor de ϵ para la 1,3 dioleína fue menor que en el caso de la trioleína, dado que este compuesto presenta 4 cromóforos de dos tipos diferentes (2 C=C y 2 C=O) mientras que la trioleína presenta 6 cromóforos de los mismos tipos (3 C=C y 3 C=O).

La modificación de la estructura química de la molécula como consecuencia del calentamiento en un reactor abierto y especialmente la conjugación de los dobles enlaces, va a modificar la longitud de onda y la intensidad de las bandas de absorción. Esto ofrece la posibilidad de obtener una información importante de la estructura de la molécula a partir de los datos espectrales (Pineda y Cárdenas, 1988).

En cuanto a los **triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP)**, su obtención se llevó a cabo mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice (apartado III.2.3.2.1). Dicha técnica permitió separar los triglicéridos no alterados de los compuestos polares. La eficacia de la separación cromatográfica se comprobó mediante cromatografía en capa fina apareciendo manchas totalmente separadas y sin contaminación. La pureza de la fracción de triglicéridos no alterados también se comprobó, de la misma forma que para la trioleína y la 1,3 dioleína, mediante cromatografía de exclusión (HPSEC) por la existencia de un sólo pico cromatográfico.

En la figura 64 se muestra el espectro de absorción UV-visible de los TGOP en disolución de THF.

Puede apreciarse que, al igual que para la trioleína y 1,3 dioleína, apareció una absorción terminal a 210,5 nm. De forma análoga pudo obtenerse el coeficiente de extinción

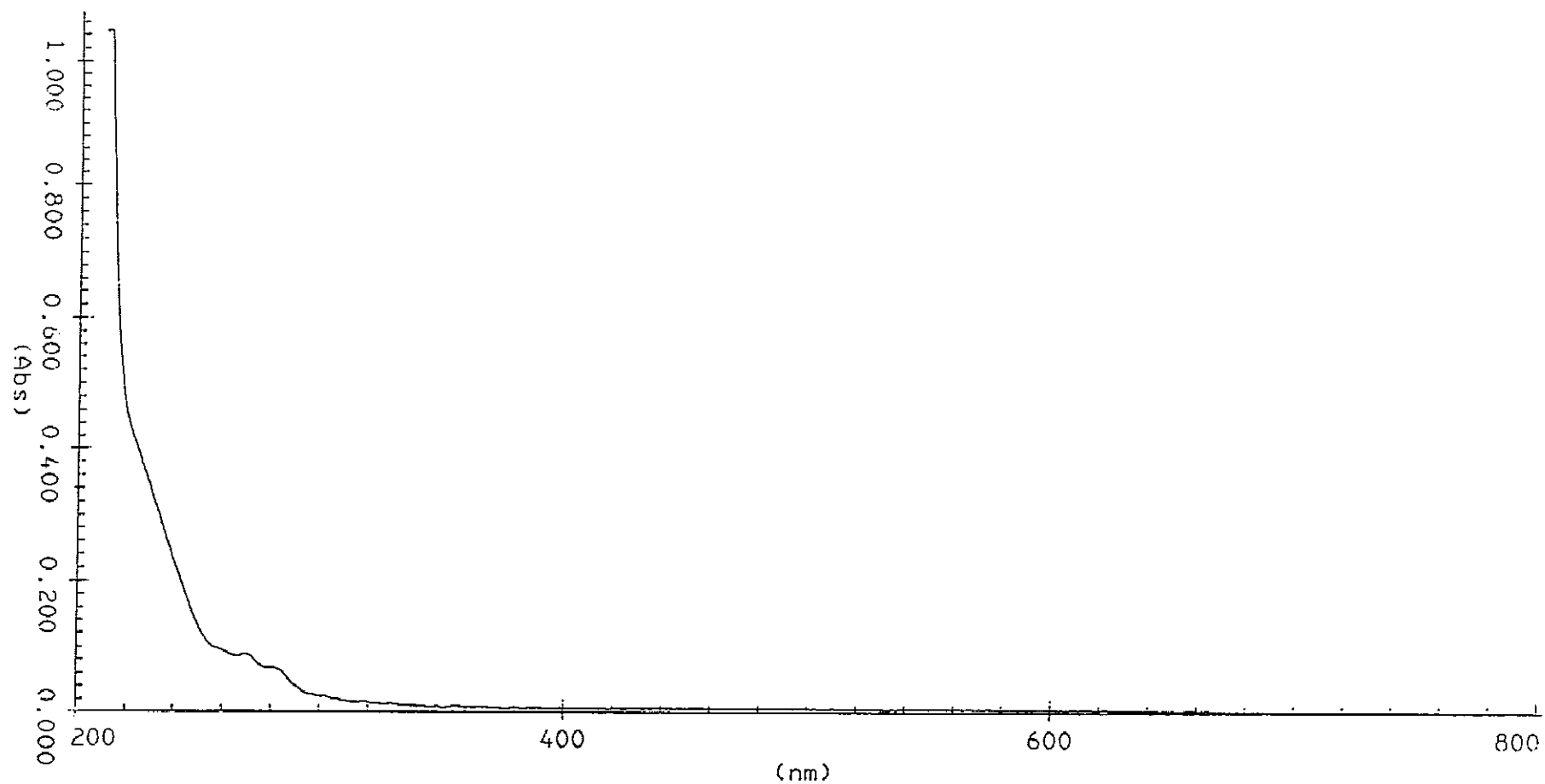


Figura 64.- Espectro de absorción UV-visible de los **TGOP** en disolución de THF.

molar a partir de la pendiente de la ecuación [8] que aparece en Materiales y Métodos (apartado III.3.1.1) y cuyo valor fue $278,2 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. El valor obtenido fue mayor que los correspondientes a la trioleína y 1,3 dioleína, lo que indica la presencia de un mayor número de grupos cromóforos en los TGOP frente a la trioleína y 1,3 dioleína. En este caso, el mayor coeficiente de extinción molar encontrado no puede ser atribuido a la existencia de un mayor número de dobles enlaces en la muestra ya que si observamos la composición en ácidos grasos mayoritarios de los TGOP sin alterar (tabla 44), el ácido oleico (monoinsaturado, C18:1) representa aproximadamente el 45% del total de los ácidos grasos de la muestra mientras que el resto se reparte entre el ácido linoleico (diinsaturado, C18:2) $\approx 10\%$ y otros ácidos grasos saturados como el ac. mirístico, ac. palmítico y ac. esteárico (C14:0, C16:0 y C18:0) que representan $\approx 1\%$, 40% y 4% respectivamente. Dicha composición en ácidos grasos de los TGOP sería similar a la encontrada en la oleína de palma de la que proceden (apartado IV.2.3.3) y a la de la oleína de palma descrita por diferentes autores (McFarlane y col., 1984).

Tabla 44. TGOP. Composición en ácidos grasos mayoritarios antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Ácidos grasos ^a	Horas de calentamiento			
	0	1	2	4
C14:0	$0,92 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,09$	$0,69 \pm 0,14$
C16:0	$38,67 \pm 0,5$	$41,81 \pm 1,3$	$42,96 \pm 0,3$	$50,16 \pm 2,1$
C18:0	$3,98 \pm 0,05$	$4,28 \pm 0,18$	$4,35 \pm 0,09$	$5,00 \pm 0,10$
C18:1	$45,86 \pm 0,6$	$44,53 \pm 1,1$	$45,25 \pm 0,8$	$35,43 \pm 1,9$
C18:2	$9,89 \pm 0,05$	$7,39 \pm 0,27$	$3,35 \pm 0,34$	$1,57 \pm 0,33$

^aLos valores están expresados en mg/100 mg de ácidos grasos totales y representan la media \pm la desviación estándar de tres determinaciones.

Por consiguiente, en el caso de los TGOP, el mayor coeficiente de extinción molar encontrado no puede justificarse por la presencia de un mayor contenido de grupos cromóforos tipo C=C. Sin embargo, dicho valor podría estar relacionado con los componentes minoritarios existentes en los aceites tales como tocoferoles, β -carotenos, etc. que si poseen el agrupamiento $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, que componen la denominada fracción insaponificable (apartado I.1.1.1.2 de la Introducción), los cuales en parte eluyen junto con los triglicéridos no polares cuando se realiza la separación de éstos mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

A pesar de que la fracción insaponificable representa una parte mínima de los aceites (<1%) (Goh y col., 1985), la gran cantidad de grupos cromóforos presente en dichos compuestos, podría justificar el mayor coeficiente de extinción molar encontrado.

IV.3.1.1. Alteración de las muestras.

La alteración de las muestras se realizó mediante calentamiento en reactor abierto y en baño de aceite a 180°C tal como se indicó en el apartado III.3.1.2 de Materiales y Métodos.

Teniendo en cuenta que el tipo de productos formados en las muestras alteradas mediante calentamiento es similar a los que aparecen como consecuencia de la fritura de patatas (Andrikopoulos y col., 1989; Billek, 1992; Peers y Swoboda, 1982), y debido a la imposibilidad de trabajar con grandes cantidades de sustancias patrón por razones económicas, puede justificarse el cambio de metodología empleado.

IV.3.1.2 Caracterización de las muestras termooxidadas.

IV.3.1.2.1 COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS.

Esta determinación se realizó únicamente en los TGOP ya que la trioleína y 1,3 dioleína presentan un único ácido graso que es el ácido oleico. Tabla 44.

En dicha tabla se recoge la composición porcentual en ácidos grasos mayoritarios de los TGOP antes y después de su calentamiento. Es conocido que durante el tratamiento termooxidativo todos los ácidos grasos, a excepción de los saturados, experimentan una degradación apreciable, tanto más elevada cuanto mayor es su grado de insaturación (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a).

Los resultados que aparecen en la tabla 44 indican que durante el calentamiento de las muestras se produjo un descenso porcentual tanto del ácido linoleico (C18:2) como del oleico (C18:1) que provocó a su vez un incremento en la proporción de los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) respectivamente (Cuesta y col., 1991a; Yoon y col., 1987).

Por otro lado, los cocientes existentes entre los valores de la composición porcentual en ácido esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), respecto a la del ácido palmítico (C16:0), en las muestras TGOP antes y después de su calentamiento a diferentes tiempos, aparecen en la tabla 45.

Tabla 45. Cocientes entre el porcentaje de los ácidos esteárico, oleico y linoleico respecto al del ácido palmítico en las muestras de TGOP antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Cocientes	Horas de calentamiento			
	0	1	2	4
C18:0/C16:0	0,10	0,11	0,10	0,10
C18:1/C16:0	1,19	1,07	1,05	0,71
C18:2/C16:0	0,26	0,17	0,08	0,03

Según los resultados que aparecen en dicha tabla, el cociente C18:0/C16:0 fue de 0,10 para los TGOP sin alterar, manteniéndose constante dicho valor a lo largo del calentamiento. Esto indica que el contenido relativo de ácidos grasos saturados (esteárico y palmítico) de los TGOP no se modificó a pesar dicho tratamiento. En cuanto a los cocientes C18:1/C16:0 y

C18:2/C16:0 disminuyeron con el calentamiento desde un valor inicial de 1,19 y 0,26 a 0,71 y 0,03 después de 4 horas respectivamente. Dicho descenso, por tanto, fue del orden de cinco veces mayor en el caso del cociente C18:2/C16:0 que del C18:1/C16:0.

Según estos datos, y, de acuerdo con lo esperado (Cuesta y col., 1991a; Gere, 1982; Yoon y col., 1987), durante el calentamiento de los TGOP se produjo una pérdida de ácidos grasos insaturados que fue casi total en el caso del ácido linoleico (diinsaturado) (88%) y menor para el ácido oleico (monoinsaturado) (22%).

Nuestros resultados, por tanto, están de acuerdo con lo descrito por diferentes autores (Cuesta y col., 1991a; Dobarganes y Pérez-Camino, 1988a; Permanyer y Boatella, 1977), que señalan que, como consecuencia del calentamiento o fritura de los aceites, el primer ácido graso que sufre importantes variaciones es el linoleico (C18:2). Además indican que el contenido de otros ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (C18:1) no se modifica hasta que no ha desaparecido la mayor parte del ácido linoleico.

IV.3.1.2.2. DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS POLARES.

Esta determinación se llevó a cabo utilizando la cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, la cual permite separar los triglicéridos no alterados del resto de los componentes presentes en una muestra de grasa cuya polaridad es superior, por lo que se denominan compuestos polares. Dichos compuestos polares se incrementan en las grasas como consecuencia de la alteración termooxidativa.

Por todo ello y teniendo en cuenta que las sustancias patrón son triglicéridos con más de un 99% de pureza, la aparición de compuestos polares en dichas muestras después de su calentamiento, representa una medida global de la alteración producida en las mismas como consecuencia de dicho proceso (Guhr y Waibel, 1978; Hernández, 1989; Lumley, 1988; Pérez-Camino, 1986; Waliking y Wessels, 1981).

En las tablas 46 y 47 aparecen los resultados de la cuantificación de cada una de las fracciones de triglicéridos no alterados y compuestos totales de las muestras de trioleína y TGOP calentadas a diferentes tiempos (1 y 2 horas y 1, 2 y 4 horas respectivamente).

Tabla 46. Trioleína. Estudio de la alteración producida como consecuencia del calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Fracciones ^a	Horas de calentamiento		
	0	1	2
Triglicéridos no polares	100	58,39	22,31
Fracción polar	--	40,47	74,02
Fracción polar retenida	--	1,14	3,67
Fracción polar total	--	41,61	77,69

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de muestra y proceden de una sola determinación.

Tabla 47. TGOP. Estudio de la alteración producida como consecuencia del calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Fracciones ^a	Horas de calentamiento			
	0	1	2	4
Triglicéridos no polares	100	83,72	63,92	39,52
Fracción polar	--	14,35	33,77	56,90
Fracción polar retenida	--	1,93	2,31	3,58
Fracción polar total	--	16,28	36,08	60,48

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de muestra y proceden de una sola determinación.

La pureza de cada una de las fracciones se comprobó mediante cromatografía en capa fina como ya se describió en Materiales y Métodos (apartado III.3.1.3).

A la vista de los resultados, se puede deducir que tanto en la trioleína como en los TGOP, como era de esperar, se produjo un incremento en la cantidad de compuestos polares durante el calentamiento acompañado de una disminución de la cantidad de triglicéridos inalterados. Además, en ambos casos, al aumentar el tiempo de calentamiento, se produjo un incremento de la cantidad de compuestos polares que no fueron eluidos y permanecieron en la columna.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en cada una de las sustancias, se puede observar que la alteración producida en la trioleína fue notablemente mayor que la de los TGOP para iguales tiempos de calentamiento. Esta mayor alteración se manifestó en una menor cantidad de triglicéridos inalterados (58,39 *versus* 83,72 mg/100 mg de muestra) en la primera y la segunda hora (22,31 *versus* 63,92 mg/100 mg de muestra) para la trioleína y los TGOP respectivamente. De la misma forma, en la trioleína se formaron mayores cantidades de compuestos polares totales que en los TGOP para iguales tiempos de calentamiento (41,61 *versus* 16,28 mg/100 mg de muestra en la primera y 77,69 *versus* 36,08 mg/100 mg de muestra en la segunda hora respectivamente).

Los resultados obtenidos indican que los TGOP son más resistentes a la alteración que la trioleína. Este hecho podría tener dos explicaciones:

i) El diferente grado de insaturación de ambas muestras que viene determinado por su composición en ácidos grasos. La trioleína presenta una mayor cantidad de dobles enlaces en su molécula que los TGOP como ya se comentó en el apartado III.3.1.3 de Caracterización de sustancias patrón, por lo que es menos estable a la termooxidación.

ii) La presencia en los TGOP de una fracción de compuestos minoritarios que constituyen la fracción insaponificable ($< 0,1\%$) y que está compuesta por sustancias tales como tocoferoles, esteroides, fosfolípidos etc, que presentan capacidad antioxidante (Cottrell, 1991; Goh y col., 1985) y ejercerían por tanto, un efecto protector a la termooxidación.

IV.3.1.2.3 ANALISIS DE PRODUCTOS ESPECIFICOS DE LA ALTERACION.

Para ello se analizó la fracción polar aislada por cromatografía en columna de las diferentes muestras utilizando la técnica de HPSEC. De esta forma, se determinó la composición en las diferentes fracciones que constituyen el componente polar de las muestras termooxidadas.

Los resultados de la composición porcentual de las fracciones que forman el componente polar obtenidos para la trioleína y los TGOP calentados a diferentes tiempos, aparecen en las tablas 48 y 49.

Tabla 48. Trioleína. Estudio de la distribución respecto del componente polar durante el calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Calentamiento (h)	Composición ^a		
	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados
1	6,97 ± 0,08	24,3 ± 0,10	68,7 ± 0,18
2	20,5 ± 0,03	25,3 ± 0,04	54,2 ± 0,01

^aLos valores están expresados en mg/100 mg de componente polar total. Dichos valores representan la media ± la desviación estándar de dos determinaciones.

TG: Triglicéridos.

Como se puede observar en la tabla 48, la fracción polar de la trioleína a lo largo del calentamiento fue enriqueciéndose en componentes poliméricos, es decir, en sustancias complejas de elevado peso molecular que aparecen como consecuencia de las reacciones de polimerización oxidativa y fundamentalmente térmica que tienen lugar en las muestras como consecuencia de las elevadas temperaturas (180°C) y la presencia de oxígeno (Andrich y col., 1994; Christopoulou y Perkins, 1989a 1989e; Firestone, 1963; Gasparoli y col., 1986; Miyashita y col., 1985; Neff y col., 1988).

De forma inversa al aumento de polímeros de triglicérido en las muestras de trioleína se produjo una disminución porcentual de la cantidad de triglicéridos oxidados a lo largo del calentamiento, sin embargo, la proporción de compuestos diméricos, que representarían un paso intermedio entre los monómeros y los polímeros, se mantuvo a niveles porcentuales constantes.

Tabla 49. TGOP. Estudio de la distribución respecto del componente polar durante el calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Calentamiento (h)	Composición ^a		
	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG oxidados
1	7,90 ± 0,05	31,8 ± 0,16	60,3 ± 0,20
2	16,3 ± 0,07	29,7 ± 0,07	54,0 ± 0,12
4	27,4 ± 0,19	24,4 ± 0,05	48,2 ± 0,01

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de componente polar total. Dichos valores representan la media ± la desviación estándar de dos determinaciones.

En cuanto a los TGOP (tabla 49), al igual que para la trioleína, a medida que aumentó el tiempo de calentamiento se produjo un enriquecimiento del componente polar de las muestras en compuestos poliméricos de elevado peso molecular que pasaron de un valor de 7,9 a 27,4 mg/100 mg de componente polar después de 1 y 4 horas de calentamiento respectivamente.

Este aumento de la polimerización del componente polar, al igual que en la trioleína, también estuvo acompañado de una disminución porcentual de los triglicéridos oxidados. Además, en este caso, se produjo una disminución en la proporción de los dímeros de triglicérido durante el calentamiento. El porcentaje de dímeros de triglicérido, como productos intermedios entre los monómeros y los productos de mayor polimerización, podría dar idea de la tasa de formación de polímeros que tiene lugar en la muestra. Así, el descenso

porcentual producido de dicha fracción de dímeros a lo largo del calentamiento indicaría que la polimerización de los compuestos diméricos se produjo en mayor medida que la dimerización de los monómeros durante el calentamiento de los TGOP, siendo la tasa de polimerización mayor a medida que aumenta el tiempo de calentamiento.

Cuando se compara la distribución de las diferentes fracciones que forman el componente polar en las muestras calentadas de trioleína y TGOP, se puede observar como durante la primera hora de calentamiento se produjo una mayor formación de compuestos oligoméricos en las muestras de TGOP frente a las de trioleína como lo indican los valores de 7,90% *versus* 6,97% de polímeros y 31,8% *versus* 24,3% de dímeros para TGOP y trioleína respectivamente. Como consecuencia de este hecho, el porcentaje de monómeros oxidados fue mayor en la trioleína que en los TGOP (68,7% *versus* 60,3%) respectivamente.

Sin embargo, durante la segunda hora de calentamiento se produjo una mayor formación de polímeros en la trioleína que en los TGOP ya que después de 2 horas la composición porcentual de los polímeros de TGOP fue más elevada para la trioleína que para los TGOP (20,5% *versus* 16,3%).

Cuando se establecieron las relaciones entre los porcentajes de dímeros de triglicérido y polímeros de triglicérido para la trioleína y TGOP a diferentes tiempos de calentamiento, los resultados obtenidos aparecen en la tabla 50.

Dichos resultados ratifican lo dicho anteriormente acerca de la mayor formación de oligómeros que se produce en las muestras de TGOP en relación a la trioleína para iguales tiempos de calentamiento. Este hecho se pone de manifiesto por los mayores valores del cociente TG oxidados/Dímeros de TG obtenidos para la trioleína frente a los TGOP (2,8 *versus* 1,9 y 2,1 *versus* 1,8 respectivamente). Sin embargo, pese a que la formación de oligómeros fue menor en la trioleína que en los TGOP, la polimerización de los dímeros una vez formados se produjo de forma más acusada en ésta, como se deduce de los menores valores obtenidos en el cociente Dímeros de TG/Polímeros de TG (3,5 *versus* 4,0 y 1,2 *versus* 1,8) para 1 y 2 horas de calentamiento respectivamente.

Tabla 50. Relaciones entre la composición porcentual de las diferentes fracciones que forman el componente polar de trioleína y TGOP a diferentes tiempos de calentamiento.

Muestra	Calentamiento (h)	TG oxidados/ Dímeros de TG	Dímeros de TG/ Polímeros de TG
Trioleína	1	2,8	3,5
	2	2,1	1,2
TGOP	1	1,9	4,0
	2	1,8	1,8
	4	2,0	0,9

Cuando se estudia la composición cuantitativa de las diferentes muestras de trioleína y TGOP antes y después de su calentamiento a diferentes tiempos, los resultados obtenidos aparecen en las tablas 51 y 52.

Tabla 51. Trioleína. Composición de las muestras antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Composición ^a	Horas de calentamiento		
	0	1	2
Triglicéridos no polares	100	58,39	22,31
Polímeros de triglicérido	--	2,90 ± 0,03	15,9 ± 0,02
Dímeros de triglicérido	--	10,1 ± 0,04	19,7 ± 0,03
Triglicéridos oxidados	--	28,6 ± 0,08	42,1 ± 0,01

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de muestra y corresponden a la media ± la desviación estándar de dos determinaciones excepto los triglicéridos no polares que es una única determinación.

Tabla 52. TGOP. Composición de las muestras antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Composición ^a	Horas de calentamiento			
	0	1	2	4
Triglicéridos no polares	100	83,72	63,92	39,52
Polímeros de triglicérido	--	1,30 ± 0,01	5,88 ± 0,03	16,6 ± 0,12
Dímeros de triglicérido	--	5,16 ± 0,02	10,7 ± 0,02	14,8 ± 0,03
Triglicéridos oxidados	--	9,82 ± 0,04	19,5 ± 0,05	29,1 ± 0,10

^a Los valores están expresados en mg/100 mg de muestra y corresponden a la media ± la desviación estándar de dos determinaciones excepto los triglicéridos no polares que es una única determinación.

De los resultados expuestos se puede deducir que tanto en la trioleína como en los TGOP se produjo un aumento cuantitativo de los productos característicos de la alteración termooxidativa que son los polímeros y dímeros de triglicéridos y los triglicéridos oxidados, como consecuencia del calentamiento. En ambos casos, el aumento más notable se produjo en los polímeros de triglicéridos, que se incrementaron en la trioleína desde 2,90 a 15,9 mg/100 mg de muestra para 1 y 2 horas de calentamiento respectivamente y en los TGOP que aumentaron desde 1,3 a 5,88 y 16,6 mg/100 mg de muestra cuando se calentaron 1, 2 y 4 horas respectivamente.

Resultados equivalentes obtuvieron diferentes autores como Kupranycz y col. (1986) calentando aceite de girasol y White y Wang (1986) cuando calentaron aceite de soja.

Puede asimismo comprobarse que en el caso de los TGOP fueron necesarias 2 horas más de calentamiento para que su contenido en productos de alteración fuera similar al de la trioleína.

Por consiguiente, cuando se compara el contenido en productos de alteración termooxidativa (polímeros y dímeros de triglicéridos y triglicéridos oxidados) entre las

muestras de trioleína y TGOP para iguales tiempos de calentamiento, se observa que éste fue siempre mayor en el caso de la trioleína. Estos resultados concuerdan con lo constatado hasta ahora acerca de la mayor resistencia de los TGOP a la alteración termooxidativa. Esto podría ser debido como ya se comentó anteriormente al menor grado de insaturación de dichas muestras y/o a la presencia en las mismas de pequeñas cantidades de compuestos con poder antioxidante (Cottrell, 1991; Goh y col., 1985).

Como ya se comentó en Materiales y Métodos en el apartado correspondiente a caracterización de muestras termooxidadas (apartado III.3.1.3), la 1,3 dioleína calentada no se separó mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice como paso previo a su análisis mediante HPSEC. Dicha separación en columna no se realizó debido a que los diglicéridos y/o sus productos de alteración eluyen todos ellos en la fracción de compuestos polares por lo que, en las condiciones utilizadas, el aislamiento de los diglicéridos inalterados del resto de compuestos de la muestra no fue posible.

Por ello, la 1,3 dioleína calentada se estudió únicamente mediante HPSEC por el análisis directo de las muestras disueltas en THF. Como consecuencia de este hecho, el pico cromatográfico correspondiente a los monómeros de diglicérido, incluye en este caso tanto a los diglicéridos oxidados como a los que no se alteraron. Esto es debido a que mediante la cromatografía de exclusión la separación de los diferentes componentes de una muestra se produce únicamente en función de su tamaño molecular y por ello, en nuestro caso, los diglicéridos aparecen como un único pico independientemente de que tengan algún resto acilo oxidado o no.

En la tabla 53 aparecen los resultados correspondientes a la composición de las muestras de 1,3 dioleína antes y después de su calentamiento durante 1 hora.

Según estos resultados, en la 1,3 dioleína se produjeron procesos de termooxidación durante el calentamiento como se deduce de la aparición de polímeros (3,80 mg/100 mg de muestra) y dímeros de diglicérido (12,1 mg/100 mg de muestra) después de 1 hora. En este caso, además, se registró una pequeña cantidad de monoglicéridos y ácidos grasos libres en la muestra como consecuencia del calentamiento, los cuales son característicos de la alteración hidrolítica, si bien la cantidad en la que aparecieron fue mínima.

Tabla 53. 1,3 Dioleína. Composición de las muestras antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

Composición ^a	Horas de calentamiento	
	0	1
Polímeros de diglicérido	--	3,80 ± 0,24
Dímeros de diglicérido	--	12,1 ± 0,42
Monómeros de diglicérido (oxidados + no oxidados)	100	83,8 ± 0,58
Monoglicéridos	--	0,25 ± 0,05
Acidos grasos	--	0,11 ± 0,02

^aLos valores están expresados en mg/100 mg de muestra y corresponden a la media ± la desviación estándar de dos determinaciones.

IV.3.1.2.4 ESPECTRO DE ABSORCION UV-VISIBLE Y MEDIDA DE LA ABSORBANCIA A 232 NM.

Trioleína: los espectros obtenidos para cada una de las muestras disueltas en THF aparecen a continuación, siendo las concentraciones utilizadas $0,648 \cdot 10^{-3} \text{M}$ y $0,368 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para la trioleína calentada 1 y 2 horas respectivamente (figuras 65 y 66).

En dichos espectros se puede observar que, como consecuencia de la alteración de las muestras, se produjo un desplazamiento de la banda de absorción hacia valores mayores de longitud de onda. Dicho máximo se situó en 211,5 y 217,0 nm para dicha muestra calentada 1 y 2 horas respectivamente, respecto de la la trioleína sin calentar, que presentaba una absorción terminal a 210 nm.

Si se comparan las concentraciones de las muestras de trioleína calentada 1 y 2 horas respecto a la de la muestra sin alterar (figura 62), puede observarse que la absorbancia obtenida a $\lambda = 232 \text{ nm}$ fue superior en el caso de las muestras alteradas aún siendo menor

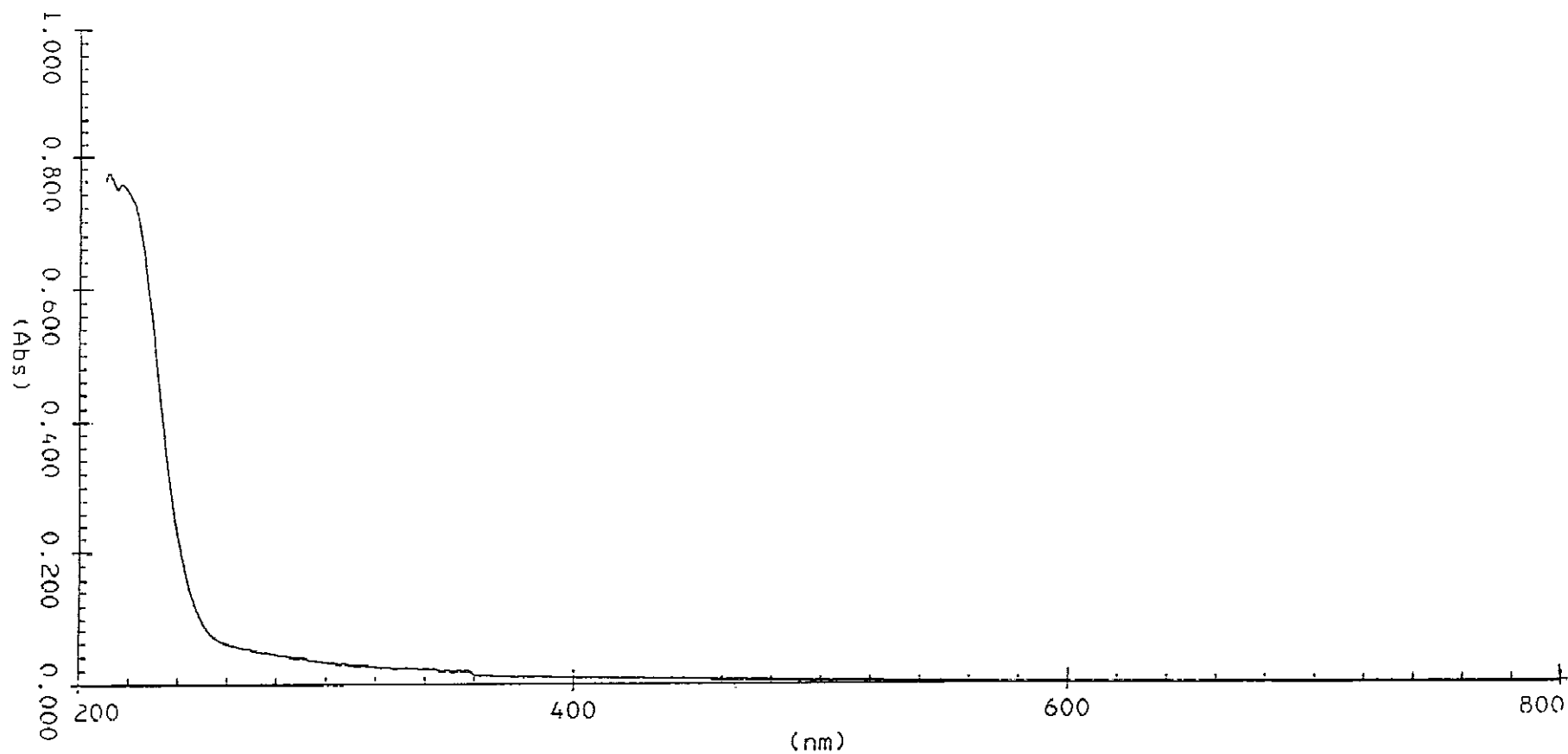


Figura 65.- Espectro de absorción UV-visible de la **trioleína calentada 1 hora a 180°C**, en disolución de THF.

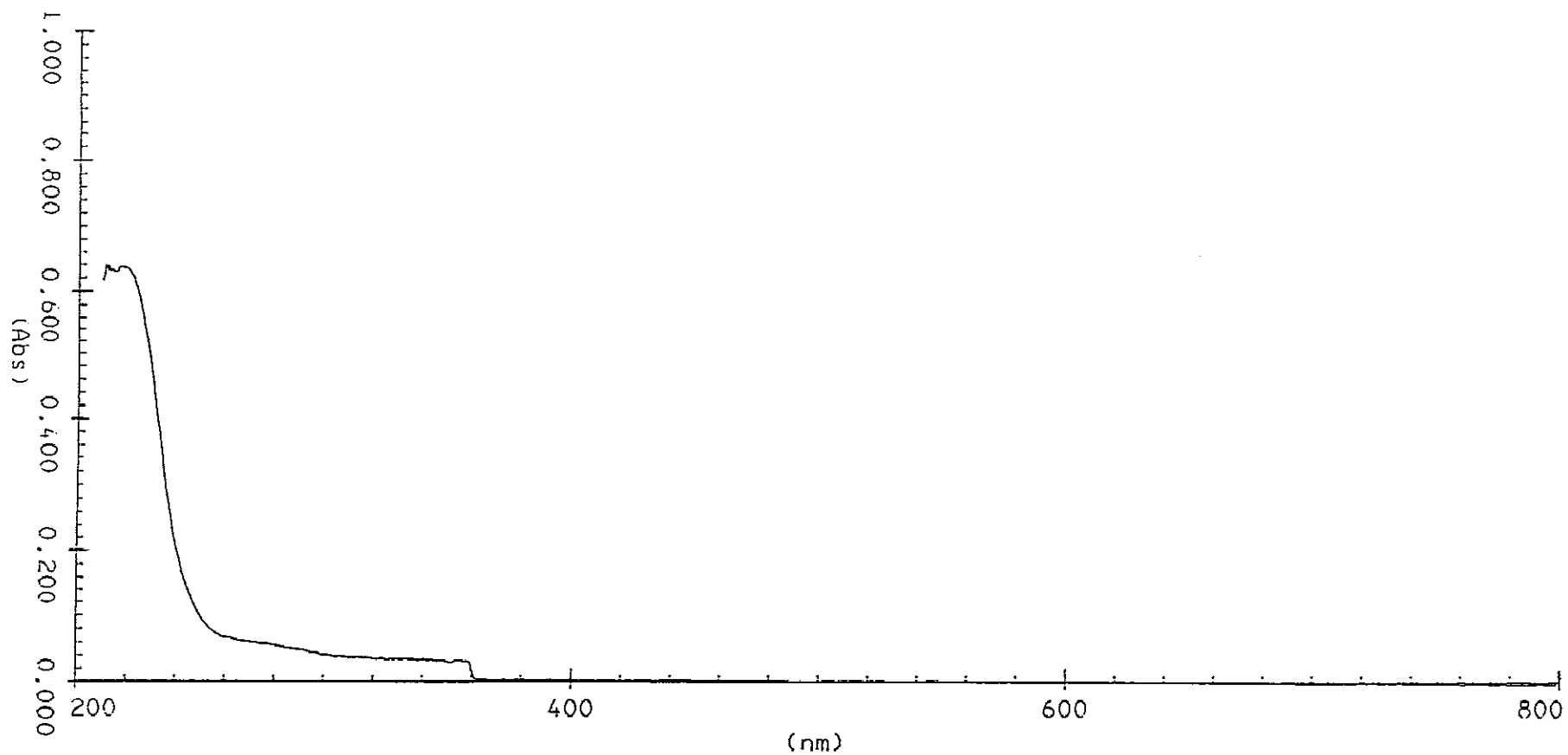


Figura 66.- Espectro de absorción UV-visible de la **trioleína calentada 2 horas a 180°C**, en disolución de THF.

su concentración. Dicha concentración debió ser menor para que el espectro realizado no se saliera de escala.

Con objeto de unificar criterios, se estableció como sistema de comparación la relación existente entre la absorbancia medida para cada una de las muestras alteradas con una concentración determinada, respecto a la absorbancia correspondiente de la muestra sin alterar para esa misma concentración. El valor de la absorbancia de la muestra sin alterar a las diferentes concentraciones se obtuvo a partir de la recta de calibrado (figura 43).

En el caso de la trioleína sin alterar, a la relación establecida le fue asignado lógicamente el valor 1, con el fin de poder compararla con el de las muestras calentadas.

En la tabla 54 se presentan los resultados obtenidos a partir de las medidas de absorbancia realizadas sobre la trioleína sin alterar y alterada 1 y 2 horas respectivamente.

Tabla 54. Trioleína. Medida de la absorbancia a $\lambda = 232$ nm de las muestras antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

	Horas de calentamiento		
	0	1	2
Concentración (M)	$2,934 \cdot 10^{-3}$	$0,648 \cdot 10^{-3}$	$0,368 \cdot 10^{-3}$
Absorbancia a 232 nm	0,237	0,398	0,452
Abs. muestra calentada/ Abs. trioleína	1 ^a	10,23	18,60

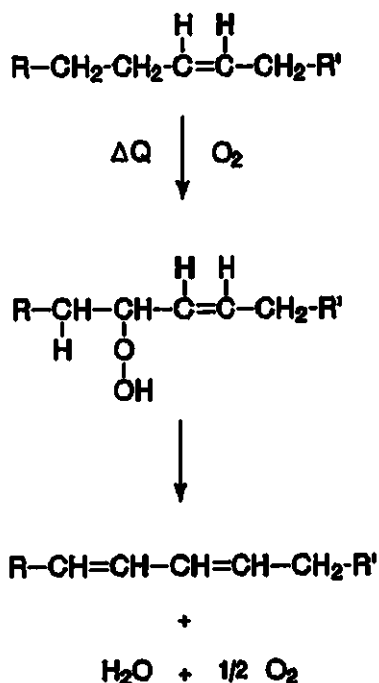
^a este valor fue asignado a la trioleína sin alterar, ya que la absorbancia no ha cambiado y la relación establecida como criterio sería la unidad.

A la vista de los datos contenidos en la tabla anterior puede comprobarse que, tanto los valores de absorbancia como la relación existente entre la absorbancia de la trioleína calentada respecto a la de la trioleína pura para la misma concentración de muestra, fueron

Resultados y Discusión

superiores en el caso de las muestras calentadas frente a las de la sustancia pura. Esto se debe fundamentalmente al hecho de que la absorbancia a 232 nm aumenta con la oxidación térmica.

Por otra parte, como ya se comentó, la banda de absorción se ensancha hacia mayores valores de longitudes de onda. Dicho desplazamiento nos indicaría un aumento de los agrupamientos tipo $C=C-C=C$ producidos por deshidrogenación oxidativa, por lo que podríamos postular el mecanismo siguiente:



Por otra parte, de la comparación de los espectros de la trioleína sin alterar y alterada, puede comprobarse que a 270 nm el valor de la absorbancia pasa de 0,38 para la trioleína sin alterar a 0,70 para la trioleína calentada 2 horas. Dicha absorbancia a 270 nm estaría relacionada con la presencia de productos secundarios de oxidación (Peers y Swoboda, 1982; Permanyer y Boatella, 1977).

La absorción de luz UV-visible en la zona de 200 a 800 nm se debe a la presencia de enlaces π . A medida que aumenta el número de enlaces π conjugados, la banda se desplaza a mayores longitudes de onda. En nuestro caso concreto se apreciaba la aparición de un máximo a 217 nm en la trioleína alterada 2 horas que sería el correspondiente a la agrupación butadieno ($C=C-C=C$) (Preisich y col., 1980).

Por otra parte, dicho aumento en el valor de la absorbancia estaría relacionado con el aumento de color de la muestra como consecuencia de la alteración y, como es sabido, la posibilidad de color de una molécula sólo existe cuando los electrones π del grupo cromóforo se solapan con otros electrones π originando un sistema π deslocalizado (Pineda y Cárdenas, 1988).

Lo anteriormente dicho podría ponerse de manifiesto por la comparación de los compuestos surgidos como consecuencia de la alteración. Si se analizan los datos de la tabla 46 puede comprobarse que entre 0 y 1 hora de calentamiento aumenta la fracción polar (compuestos que contribuyen a la variación de la absorbancia) de 0 a 41 %, y entre 1 y 2 horas esta variación llega hasta el 78%.

Finalmente, si se analizan los datos de la composición total de las muestras (tabla 51) se puede comprobar que en el desglose de los componentes de la fracción polar, se produce un aumento de los triglicéridos oxidados de 28,6 a 42,1 mg/100 mg de muestra respectivamente entre 1 y 2 horas de calentamiento. Este tipo de compuestos son los que contribuirían más al aumento de la absorbancia a 232 nm ya que dicha propiedad es un índice de la oxidación de las grasas.

1,3 dioleína: En la figura 67, se muestra el espectro de absorción UV-visible de la 1,3 dioleína alterada durante 1 hora.

Comparando los valores de absorbancia a 232 nm de las muestras sin alterar y alteradas como se indica en la tabla 55, se observa que al igual que ocurría en el caso de la trioleína, la absorbancia fue mayor en la muestra alterada aún siendo menor la concentración analizada de dicha muestra, por lo que podríamos sacar conclusiones análogas a las obtenidas anteriormente.

Sin embargo, la relación de la absorbancia de la 1,3 dioleína calentada respecto a la misma sin calentar para la misma concentración de ambas, comparada con dicha relación en la trioleína para iguales tiempos de calentamiento (tabla 54), fue menor. Los resultados obtenidos no se justifican por la alteración de la muestra de 1,3 dioleína calentada ya que, comparando las cantidades de compuestos diméricos y poliméricos, la alteración producida fue similar en ambos patrones después de 1 hora de calentamiento. Sin embargo, en este caso el contenido en monómeros oxidados no pudo determinarse al aparecer únicamente como un pico cromatográfico junto con los diglicéridos no alterados.

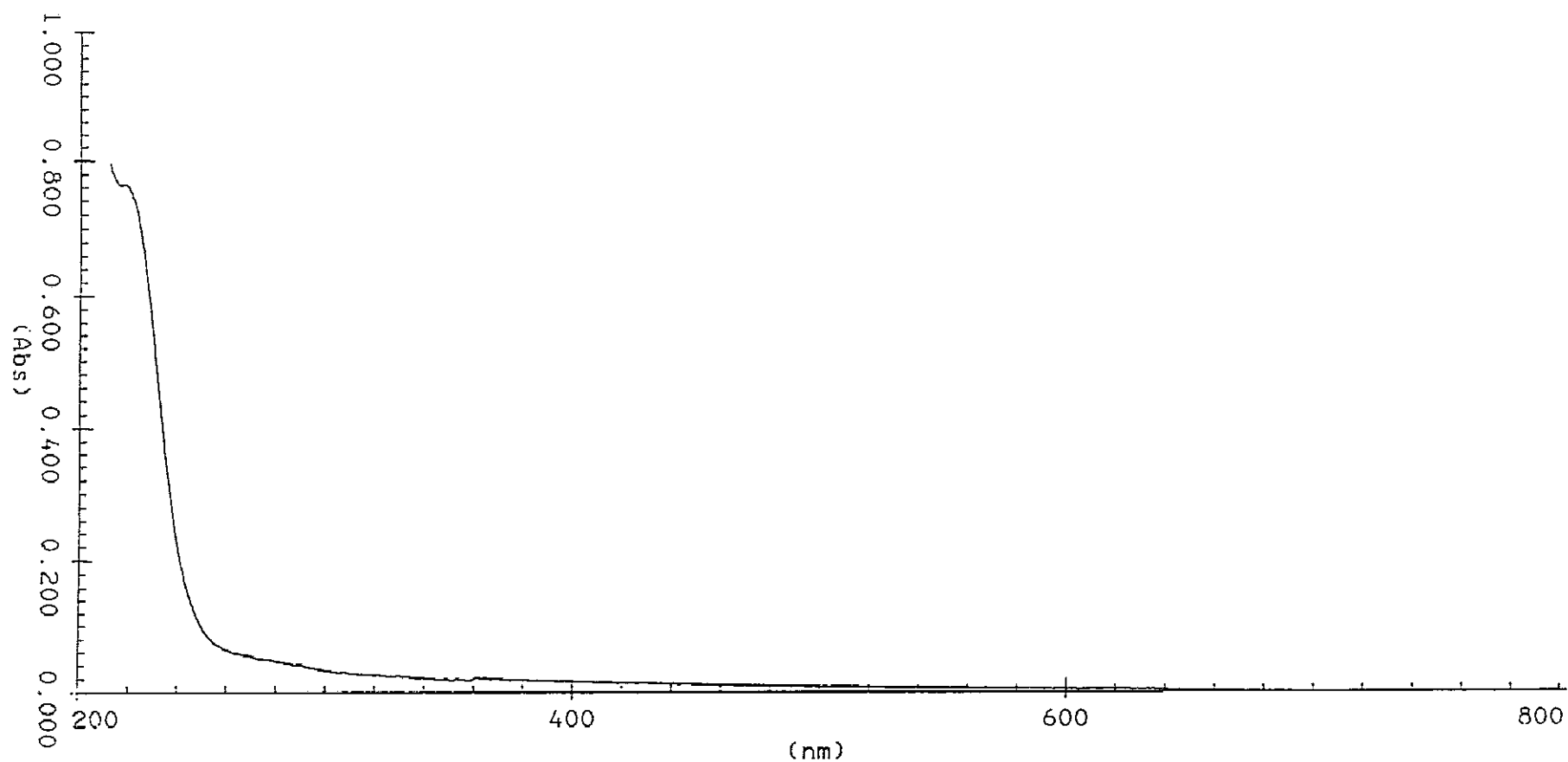


Figura 67.- Espectro de absorción UV-visible de la 1,3 dioleína calentada 1 hora a 180°C, en disolución de THF.

Tabla 55. 1,3 dioleína. Medida de la absorbancia a $\lambda = 232$ nm antes y después de su calentamiento durante 1 hora en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

	Horas de calentamiento	
	0	1
Concentración (M)	$5,640 \cdot 10^{-3}$	$0,814 \cdot 10^{-3}$
Absorbancia a 232 nm	0,432	0,453
Abs. muestra calentada/ Abs. 1,3 dioleína	1 ^a	5,940

^a valor asignado a la relación para la 1,3 dioleína sin alterar.

TGOP: Los espectros UV-visible obtenidos para cada una de las muestras disueltas en THF se muestran a continuación, donde las concentraciones empleadas en cada caso de $0,62 \cdot 10^{-3}\text{M}$, $0,41 \cdot 10^{-3}\text{M}$ y $0,49 \cdot 10^{-3}\text{M}$ para los TGOP después de 1,2 y 4 horas de calentamiento respectivamente (figuras 68, 69 y 70).

Como se puede apreciar en los espectros, en todos los casos aparece la absorción terminal a 211 nm el cual ya existía en la muestra sin calentar (figura 64). Además, se puede observar que al igual que ocurría en el caso de la trioleína, en los TGOP se produjo un desplazamiento de la banda de absorción hacia valores mayores de longitud de onda como consecuencia de la alteración de las muestras. Sin embargo, a diferencia de lo que sucedía en la trioleína, las muestras de TGOP alteradas presentaron un desdoblamiento de la banda de absorción que provocó la aparición, en todos los casos, de otra zona de absorción terminal en torno a 225 nm. Asimismo, en los TGOP calentados se produjo un aumento de la absorbancia en la región de 270 nm que se tradujo en valores de absorbancia de 0,08, 0,1 y 0,13 en las muestras calentadas 1, 2 y 4 horas respectivamente frente al valor de 0,09 registrado en el espectro de la muestra sin alterar teniendo en cuenta, además, que la concentración de esta

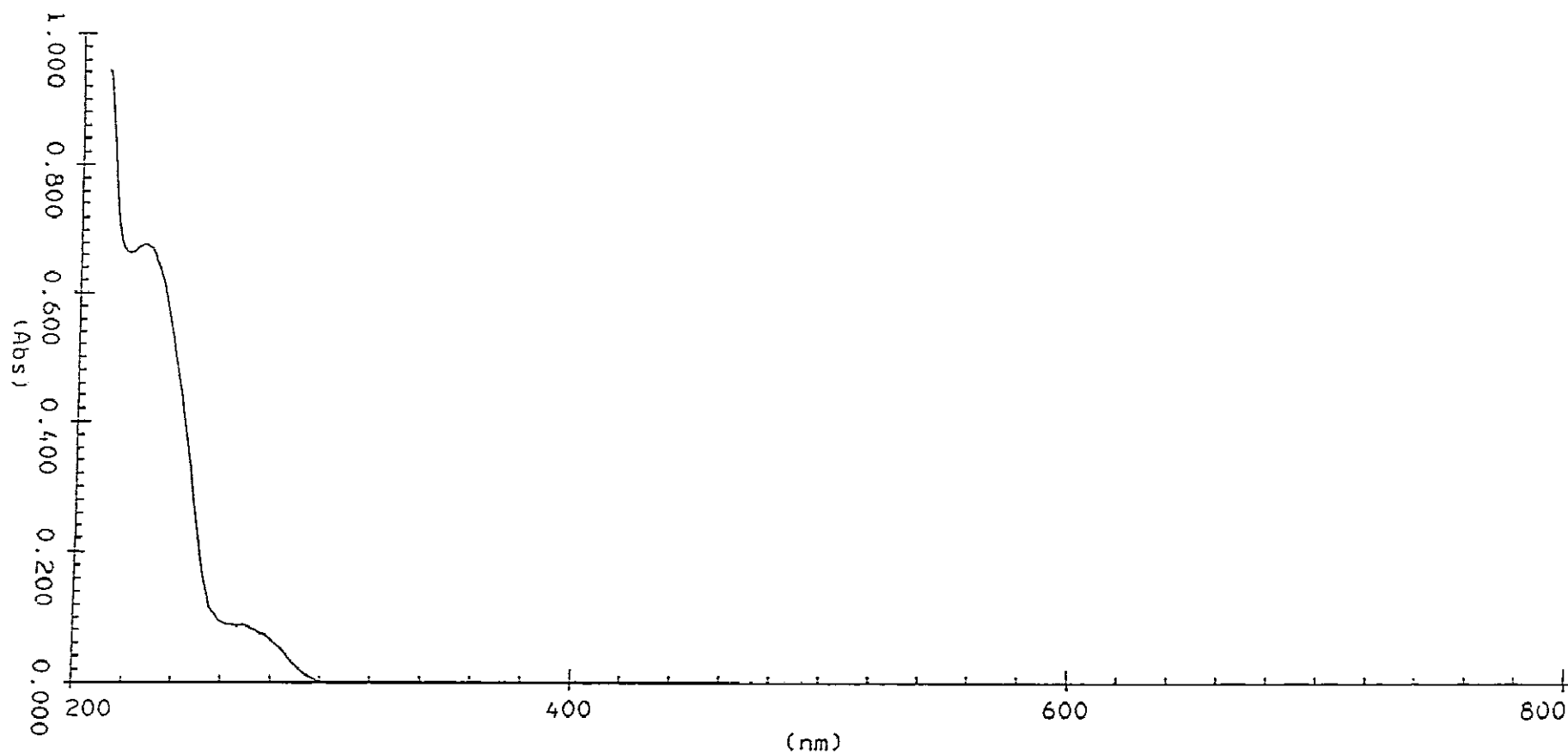


Figura 68.- Espectro de absorción UV-visible de los **TGOP** calentados 1 hora a 180°C, en disolución de THF.

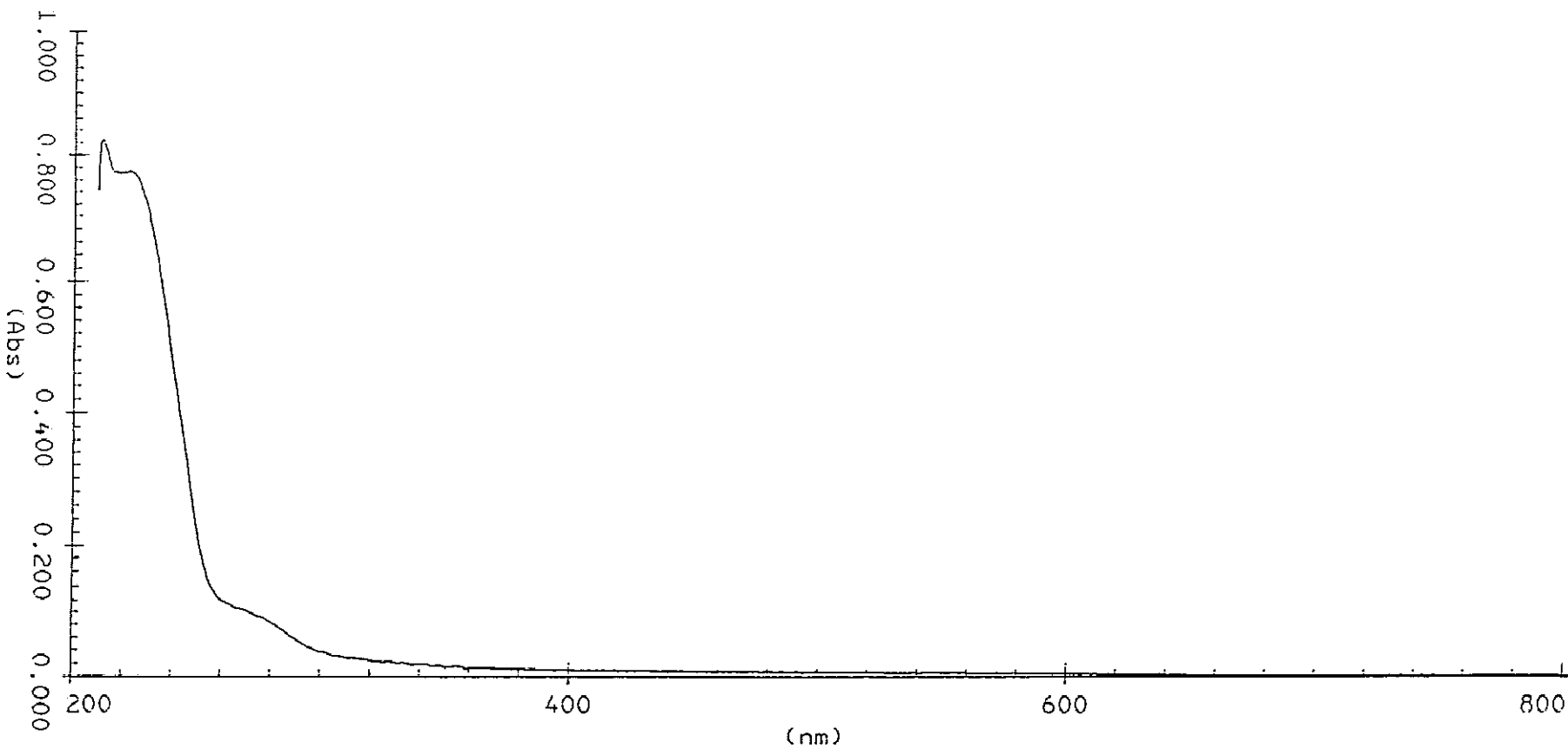


Figura 69.- Espectro de absorción UV-visible de los **TGOP** calentados 2 horas a 180°C, en disolución de THF.

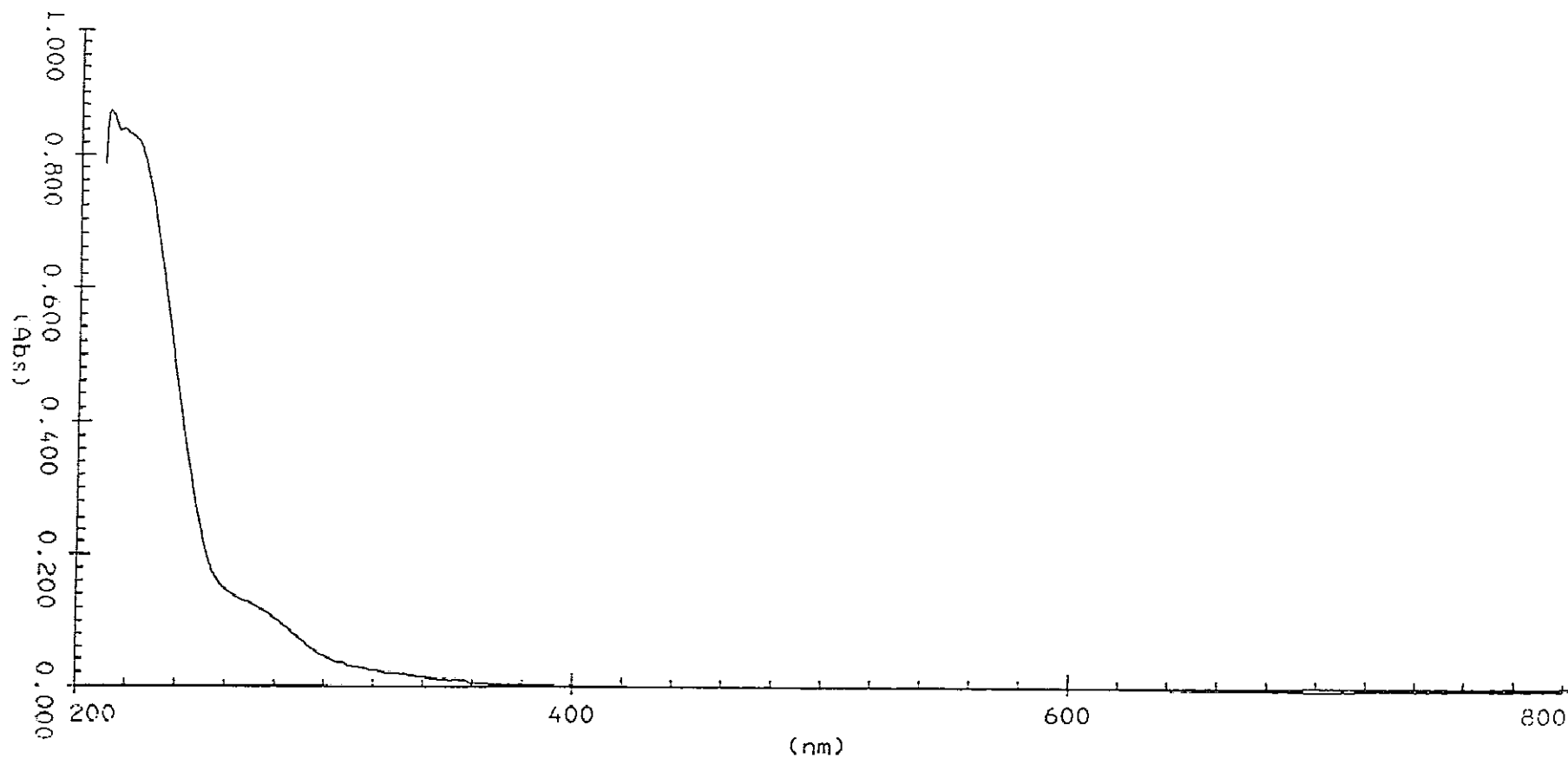


Figura 70.- Espectro de absorción UV-visible de los **TGOP** calentados 4 horas a 180°C, en disolución de THF.

última fue mucho mayor (figura 64). Como ya se comentó anteriormente, la absorción en esta zona del espectro estaría relacionada con la presencia de productos secundarios de oxidación (Permanyer y Boatella, 1977).

Los resultados obtenidos a partir de la medida de la absorbancia a 232 nm de los TGOP antes y después de calentarse aparecen en la tabla 56.

Tabla 56. TGOP. Medida de la absorbancia a $\lambda = 232$ nm de las muestras antes y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite.

	Horas de calentamiento			
	0	1	2	4
Concentración (M)	$1,15 \cdot 10^{-3}$	$0,62 \cdot 10^{-3}$	$0,41 \cdot 10^{-3}$	$0,49 \cdot 10^{-3}$
Absorbancia a 232 nm	0,310	0,638	0,665	0,667
Abs. muestra calentada/ Abs. TGOP	1 ^a	3,47	5,22	4,50

^a valor asignado a la relación para los TGOP sin alterar.

En esta tabla se presentan los valores de la absorbancia a 232 nm obtenidos para diferente concentración de muestra. Por ello, de la misma forma que para la trioleína y la 1,3 dioleína, se estableció como sistema de comparación la relación existente entre la absorbancia medida para cada una de las muestras alteradas con una concentración determinada, respecto a la absorbancia correspondiente de la muestra sin alterar para esa misma concentración. Para ello, la absorbancia a 232 nm de la muestra sin alterar a diferentes concentraciones se obtuvo a partir de la recta de calibrado (figura 45). A la muestra sin alterar de TGOP se le asignó el valor de 1. En dicha tabla se puede observar que los valores de la absorbancia a 232 nm de las muestras alteradas (0,638, 0,665 y 0,667 para los TGOP calentados 1, 2 y 4 horas respectivamente) fueron siempre superiores a las de la muestra sin alterar (0,310), a pesar de que la concentración de la disolución utilizada de esta última fue mayor.

En cuanto a los valores de la relación establecida (Absorbancia de los TGOP calentados/Absorbancia de los TGOP sin calentar) fueron de 3,47, 5,22 y 4,50 para las

muestras después de 1,2 y 4 horas de calentamiento respectivamente. Dichos valores indican que no existe una tendencia clara en su variación a medida que aumenta el tiempo de calentamiento de la muestra. Estos resultados podrían ser debidos a que como se puede observar en los espectros de absorción de las muestras de TGOP alteradas (figuras 68, 69 y 70), en el caso de los TGOP calentados 1 hora el valor de la absorbancia a 232 nm recayó en la zona correspondiente al segundo máximo. Sin embargo, cuando se trata de las muestras de TGOP calentados 2 y 4 horas, el valor de la absorbancia a 232 nm se encontraba situado en el hombro de dicho máximo, por lo que la medida podría estar sujeta a mayor cantidad de error.

Si se compara el valor de este cociente con la presencia de compuestos oxidados en la muestra se observa que para 1 hora de calentamiento el aumento de los triglicéridos oxidados en la muestra vendría acompañado por un aumento de la absorbancia de la misma a 232 nm. Para mayores tiempos de calentamiento (2 y 4 horas), el aumento de los productos de oxidación en la muestra, no se reflejaría en mayores valores en la absorbancia a 232 nm. Esto podría ser debido a la aparición de una segunda banda de absorción que modifica su intensidad debido a la degradación.

Cuando se compara la absorbancia a 232 nm de los TGOP y trioleína para iguales tiempos de calentamiento, se observa que los valores de los cocientes entre la absorbancia de las muestras calentadas y la de la sustancia patrón de partida, fueron siempre superiores en la trioleína para iguales tiempos de calentamiento (10,23 *versus* 3,47 y 18,60 *versus* 5,22 en 1 y 2 horas respectivamente).

Esto vendría a confirmar de nuevo la mayor resistencia de los TGOP a la alteración oxidativa que se manifiesta por ello en la menor formación de compuestos específicos de dicha alteración que son los triglicéridos oxidados (Pérez-Camino y col., 1990), lo cual se refleja en la menor absorbancia de estas muestras en la región de $\lambda = 232$ nm.

Se debe hacer constar que el hecho de que en las muestras originales de trioleína y TGOP el coeficiente de extinción molar fuera mayor en éstas últimas (278,2 *versus* 81,3 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$), no está en desacuerdo con los mayores incrementos encontrados en la absorbancia para la trioleína frente a los TGOP para iguales tiempos de calentamiento. Esto es debido a que el aumento de la absorbancia a 232 nm estaría relacionado con el aumento de productos de oxidación en la muestra y los TGOP son más resistentes a oxidarse.

IV.3.2 ESTUDIO CINETICO DE LA HIDROLISIS DE SUSTANCIAS PATRON Y ACEITES VEGETALES CON DIFERENTE GRADO DE TERMOOXIDACION.

A fin de determinar si, i) la alteración termooxidativa ocasionada por el calentamiento de las diferentes sustancias patrón y, ii) la alteración termooxidativa e hidrolítica producida en los distintos aceites vegetales durante la fritura de patatas, afectaba o no al comportamiento catalítico de la lipasa pancreática porcina, se procedió a realizar un seguimiento cinético de la hidrólisis enzimática mediante la técnica de pH-stato (apartado III.3.1.4). Este estudio, de carácter básico, intenta modelizar el comportamiento de los aceites alterados o no, dentro del tracto digestivo y comprobar su susceptibilidad a la hidrólisis catalizada por lipasas. Se eligió la lipasa pancreática porcina por ser la lipasa mas accesible perteneciente a un mamífero.

IV.3.2.1 Hidrólisis de sustratos modelo.

Los sustratos utilizados fueron:

a) Aceite de oliva emulsionado (Sigma). Este preparado es usado habitualmente como reactivo de referencia para la determinación de la actividad lipásica.

b) Trioleína. Se determinó la actividad lipásica utilizando dicho sustrato sin alterar y después de su calentamiento en reactor abierto a 180°C en baño de aceite durante 1 y 2 horas.

c) 1,3 dioleína. Se usó dicho sustrato puro y calentado durante 1 hora a 180°C de forma análoga a la descrita para la trioleína.

IV.3.2.1.1 ACEITE DE OLIVA EMULSIONADO (SIGMA).

Para conocer exactamente la concentración molar del sustrato en el medio de reacción, se midió la densidad de dicho preparado comercial y se calculó su peso molecular en función de la composición promedio de dicho aceite en ácidos grasos (Paul y Southgate, 1979).

Los resultados obtenidos de velocidad inicial de hidrólisis a diferente concentración de sustrato aparecen en la tabla 57. En dicha tabla, los valores que aparecen son la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Tabla 57. Estudio cinético del aceite de oliva emulsionado (Sigma) frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}$) $\cdot 10^3$	r
2,76	44,1 \pm 1,5	0,999
6,89	63,5 \pm 3,8	0,999
13,8	74,1 \pm 2,8	0,999
20,7	82,0 \pm 9,2	0,999
27,6	87,5 \pm 3,9	0,999

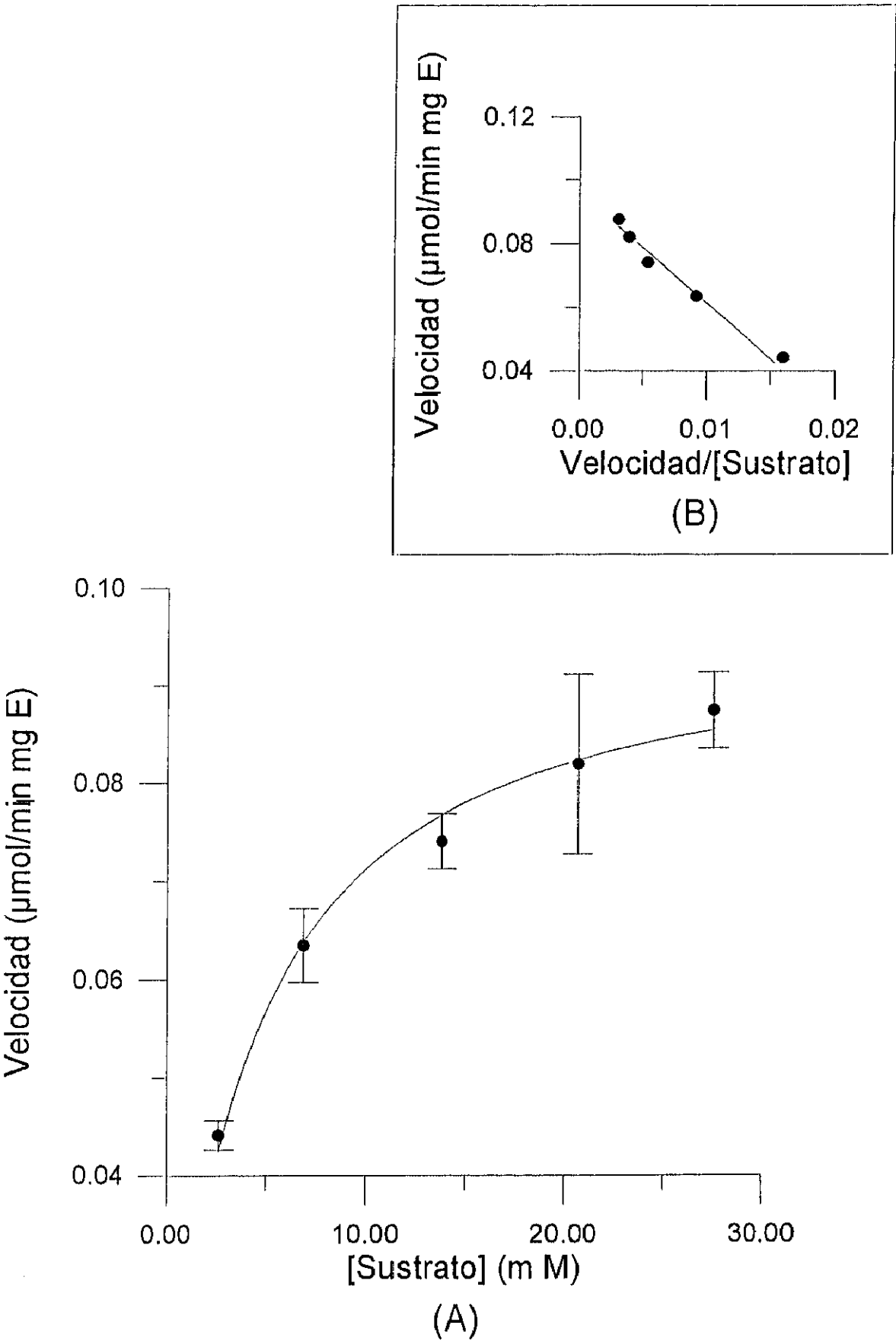
Como ya se mencionó en Materiales y Métodos (apartado III.3.1.4.1) las reacciones de lipólisis se siguieron mediante el registro del consumo, de NaOH utilizada como agente valorante a lo largo del tiempo.

La velocidad de reacción se obtuvo del cálculo de la pendiente del tramo recto de la curva de consumo de NaOH añadida en función del tiempo para cada una de las diferentes concentraciones de sustrato utilizadas, teniendo en cuenta que, en todos los casos estudiados, se observó un periodo de inducción que se produjo durante los dos primeros minutos de ensayo. El ajuste de los puntos experimentales se realizó mediante una regresión simple, obteniéndose una gran linealidad que se demuestra por el elevado valor de los coeficientes de correlación ($r=0.999$) obtenido en todos los casos (tabla 57). Dicho ajuste se realizó usando el programa POLNOM del paquete SIMFIT (Bardsley, 1992).

Posteriormente se representaron los valores de las velocidades iniciales de reacción en función de la concentración de sustrato existente en el reactor. Dicha representación aparece en la figura 71 (A) donde se puede apreciar que la hidrólisis enzimática estudiada parece obedecer a un modelo de cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten. Por otra

Figura 71.- Emulsión comercial de aceite de oliva (Sigma).

- (A) Representación gráfica (v -[S])
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).



parte, la gráfica de Eadie-Hofstee (figura 71 (B)) que consiste en la representación de la velocidad frente al cociente de velocidad/[sustrato] presenta un comportamiento lineal, como corresponde a un comportamiento michaeliano lo que confirmaría que este sustrato cumple la ecuación de Michaelis-Menten en las condiciones estudiadas.

El ajuste de los datos experimentales se realizó utilizando el programa MMFIT del paquete SIMFIT (Bardsley, 1992). Mediante dicho programa los valores de velocidad de reacción para cada una de las diferentes concentraciones de sustrato utilizadas se ajustaron a un modelo cinético suma de ecuaciones de Michaelis-Menten. La ecuación que corresponde a dicho modelo tendría diferentes términos y sería la siguiente:

$$y = \frac{V_{\text{máx}}(1) * x}{K_m(1) + x} + \frac{V_{\text{máx}}(2) * x}{K_m(2) + x} + \dots + \frac{V_{\text{máx}}(n) * x}{K_m(n) + x}$$

Al objeto de determinar cuantos términos deberíamos considerar para nuestro caso concreto se realizaron ajustes de los datos a ecuaciones con diferente número de términos obteniéndose muy buenos resultados para un único término de dicha ecuación, sin que fuera estadísticamente significativo el ajuste de los datos a ecuaciones con mayor número de parámetros, (v.g. dos términos de Michaelis-Menten), por lo que se puede concluir que el ajuste de los datos a una sola ecuación de Michaelis-Menten es estadísticamente suficiente, lo que coincidiría por otra parte con el aspecto gráfico hiperbólico observado en la figura 71-A y el carácter lineal de la representación de Eadie-Hofstee (fig 71-B). Precisamente, la línea superpuesta a los puntos en ambas figuras corresponde al ajuste numérico de dichos puntos a la ecuación de Michaelis-Menten, observándose una buena concordancia que fue confirmada por los correspondientes test estadísticos que aplica el programa MMFIT.

Asimismo, a partir del ajuste realizado, el programa MMFIT nos proporcionó los valores de los parámetros K_m (constante de Michaelis-Menten) y $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima de reacción).

Puesto que el proceso por nosotros considerado tiene lugar a nivel interfacial, no se puede considerar en ningún caso que el enzima sea saturado por el sustrato, condición necesaria por otro lado para considerar el proceso michaeliano, de ahí que los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ obtenidos sean únicamente aparentes (K_m^{ap} y $V_{\text{máx}}^{\text{ap}}$).

El valor de dichos parámetros cinéticos encontrados cuando se utilizó la emulsión comercial de aceite de oliva como sustrato de la lipasa pancreática fue:

$$K_m^{ap} = 3,5 \pm 0,7 \text{ mM}$$

$$V_{max}^{ap} = 96,3 \cdot 10^{-3} \pm 4,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/min mg E}$$

$$V_{max}^{ap}/K_m^{ap} = 2,75 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg E}^{-1} \text{ mM}$$

Como se puede observar, además de K_m^{ap} y V_{max}^{ap} , se ha incluido también la relación V_{max}^{ap}/K_m^{ap} , que es un parámetro conocido con el nombre de constante de especificidad (Fersht, 1985) y que hace referencia a la especificidad de la enzima para discriminar entre sustratos diferentes que compitieran por la enzima en el mismo medio de reacción. Este parámetro nos puede luego servir para comparar especificidades por distintos sustratos.

IV.3.2.1.2 TRIOLEINA Y 1,3 DIOLEINA.

En las tablas 58 y 59 aparecen los resultados obtenidos de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de sustrato de la trioleína y 1,3 dioleína respectivamente, durante la hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina. En dichas tablas aparecen el valor de la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Tabla 58. Estudio cinético de la trioleína frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol/min mg E}$) $\cdot 10^3$	r
0,08	21,8 \pm 2,3	0,994
0,16	29,2 \pm 9,4	0,996
0,32	33,4 \pm 3,6	0,995
0,48	39,2 \pm 3,2	0,997
0,64	39,5 \pm 3,0	0,997
0,81	44,3 \pm 4,2	0,996
1,21	47,3 \pm 1,1	0,998

Tabla 59. Estudio cinético de la 1,3 dioleína frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}$) $\cdot 10^3$	r
0,05	19,5 \pm 0,1	0,984
0,11	23,1 \pm 0,1	0,981
0,22	31,5 \pm 1,5	0,995
0,32	34,7 \pm 0,2	0,996
0,43	36,5 \pm 0,1	0,995
0,54	41,5 \pm 1,2	0,993
0,81	48,0 \pm 1,2	0,994

Los resultados obtenidos se ajustaron bien, en ambos casos, al modelo cinético de Michaelis-Menten, como se deduce de las representaciones gráficas, en especial la de Eadie-Hofstee (la más sensible a las desviaciones del modelo), indicadas a continuación en las figuras 72 y 73. De nuevo esta ecuación resultó ser estadísticamente la más adecuada, no existiendo fundamento numérico para un ajuste a ecuaciones con mayor número de parámetros.

Asimismo, también se estudiaron las velocidades de reacción enzimática utilizando como sustrato la trioleína y 1,3 dioleína calentadas 1 y 2 horas, y 1 hora respectivamente. Los resultados aparecen en las tablas 60, 61 y 62.

Los valores que aparecen en dichas tablas son la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Figura 72.- Trioleína.

- (A) Representación gráfica (v -[S])
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

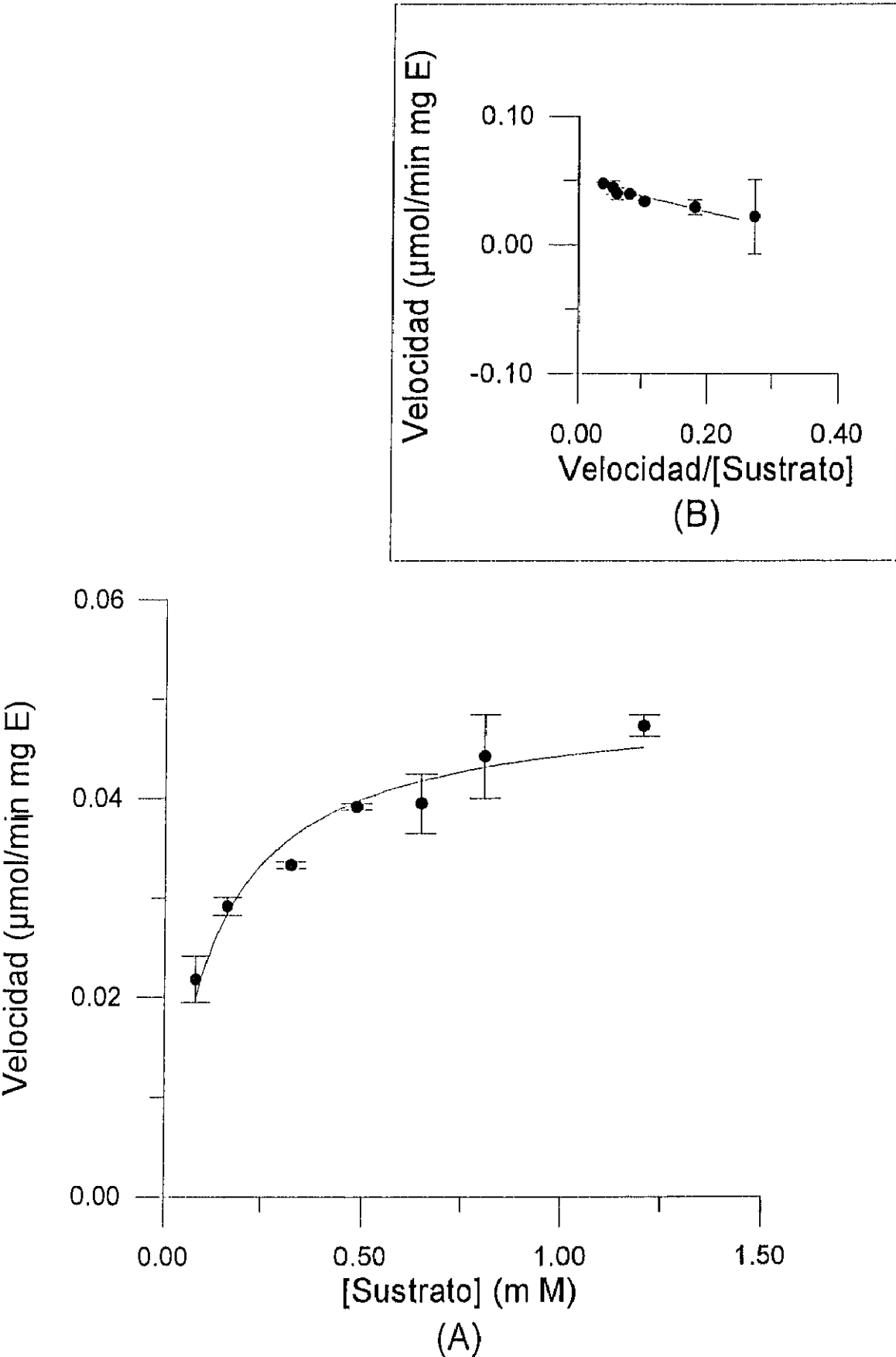


Figura 73.- 1, 3 Dioleína.

(A) Representación gráfica (v - $[S]$)

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

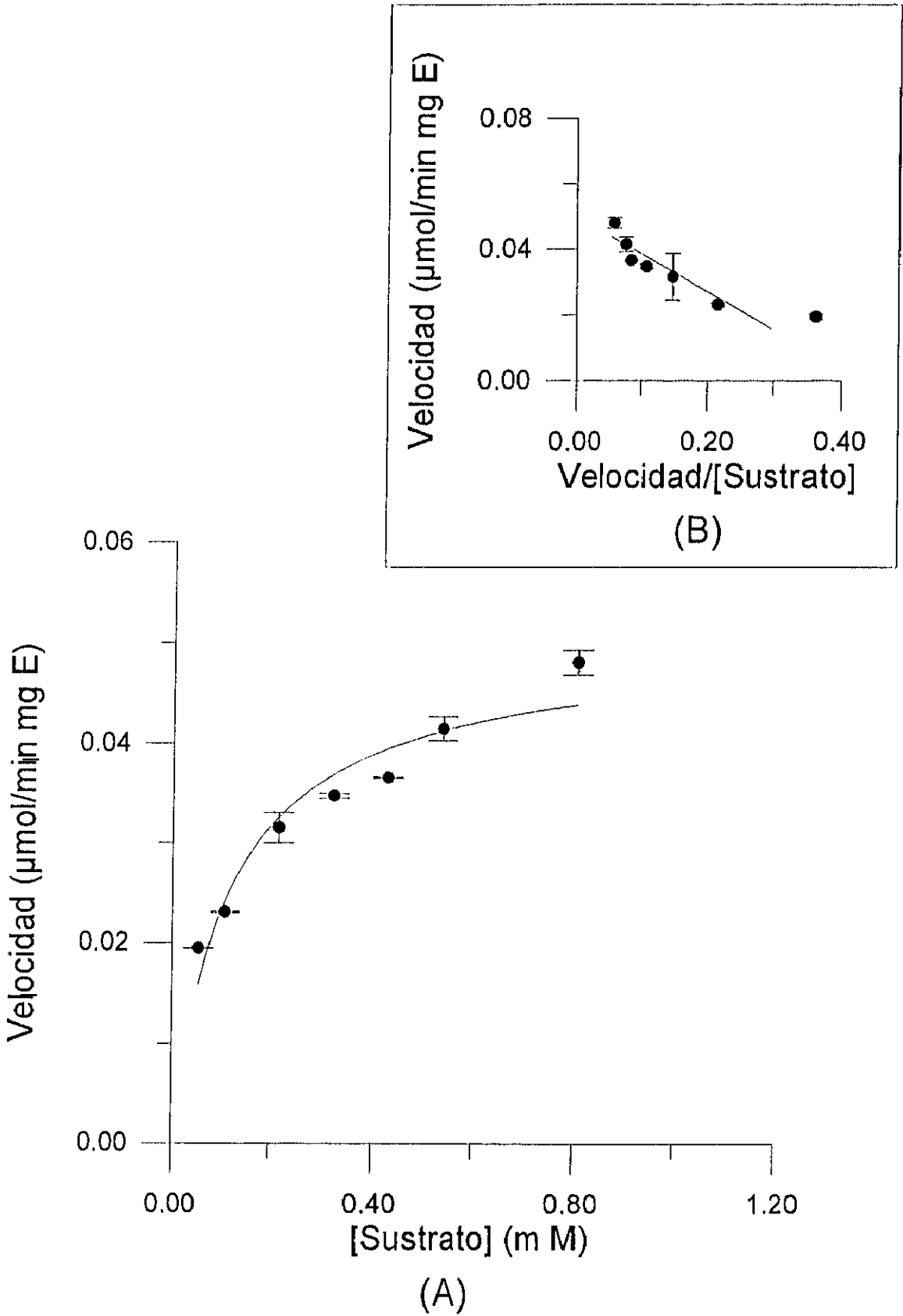


Tabla 60. Estudio cinético de la trioleína calentada durante 1 hora a 180°C frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,08	22,5 \pm 1,0	0,994
0,16	30,6 \pm 1,1	0,990
0,31	44,5 \pm 0,4	0,998
0,46	51,7 \pm 1,0	0,999
0,62	58,4 \pm 3,3	0,998
0,77	61,9 \pm 4,8	0,997
1,16	65,6 \pm 1,8	0,999

Tabla 61. Estudio cinético de la trioleína calentada durante 2 horas a 180°C frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,07	28,4 \pm 0,9	0,997
0,14	33,9 \pm 0,1	0,995
0,29	46,1 \pm 1,8	0,996
0,43	65,7 \pm 2,6	0,999
0,57	65,8 \pm 3,8	0,995
0,72	73,4 \pm 0,1	0,999
1,07	74,4 \pm 1,4	0,998

Tabla 62. Estudio cinético de la 1,3 dioleína calentada durante 1 hora a 180°C frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}$) $\cdot 10^3$	r
0,11	25,0 \pm 0,3	0,984
0,22	45,2 \pm 0,9	0,999
0,34	57,1 \pm 0,8	0,999
0,56	70,6 \pm 1,9	0,998
0,84	89,8 \pm 0,3	0,997

De igual forma que para dichas sustancias patrón sin alterar, las muestras calentadas se ajustaron bien a un modelo michaeliano, como se deduce de las representaciones gráficas que aparecen a continuación de la hidrólisis de trioleína y 1,3 dioleína después de 2 y 1 hora de calentamiento respectivamente (figuras 74 y 75), y como se confirmó estadísticamente mediante los test que utiliza el programa MMFIT.

En las tablas 63 y 64 se muestran los valores obtenidos de los parámetros cinéticos K_m^{ap} , V_{max}^{ap} y V_{max}^{ap}/K_m^{ap} , para los sustratos sin alterar y alterados de trioleína y 1,3 dioleína, respectivamente.

En dichas tablas (63 y 64) puede observarse que tanto la trioleína como la 1,3 dioleína sin tratar presentaron idénticos valores de K_m^{ap} y V_{max}^{ap} , tal como cabía esperar ya que la lipasa actuaría sobre el mismo tipo de enlace $-\text{CH}_2\text{-O-CO-R}$ (ácido oleico) tanto en un caso como en otro.

Figura 74.- Trioleína calentada 2 horas a 180°C.

(A) Representación gráfica (v -[S])

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

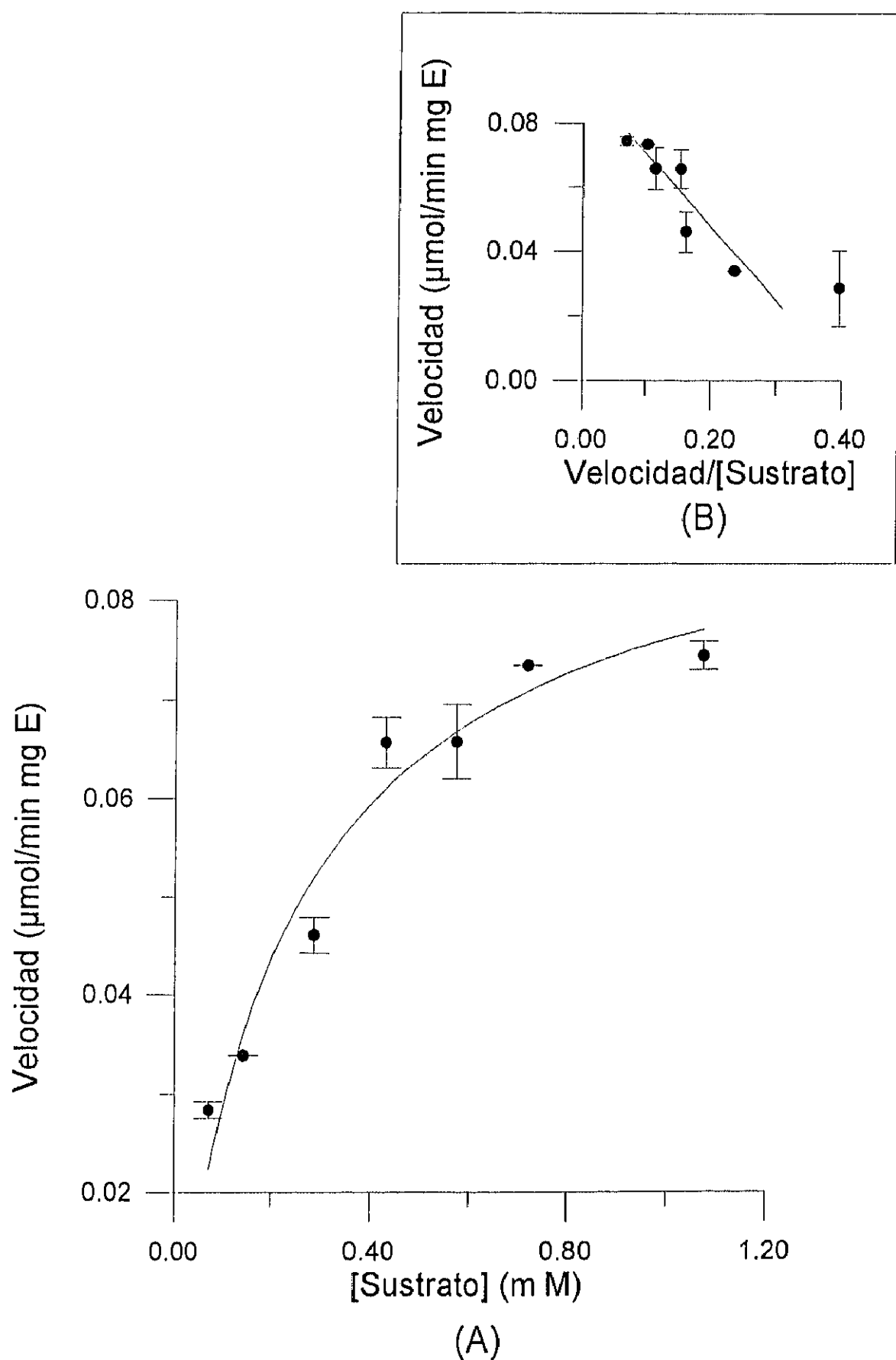


Figura 75.- 1,3 dioleína calentada 1 hora a 180°C.

(A) Representación gráfica (v -[S])

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

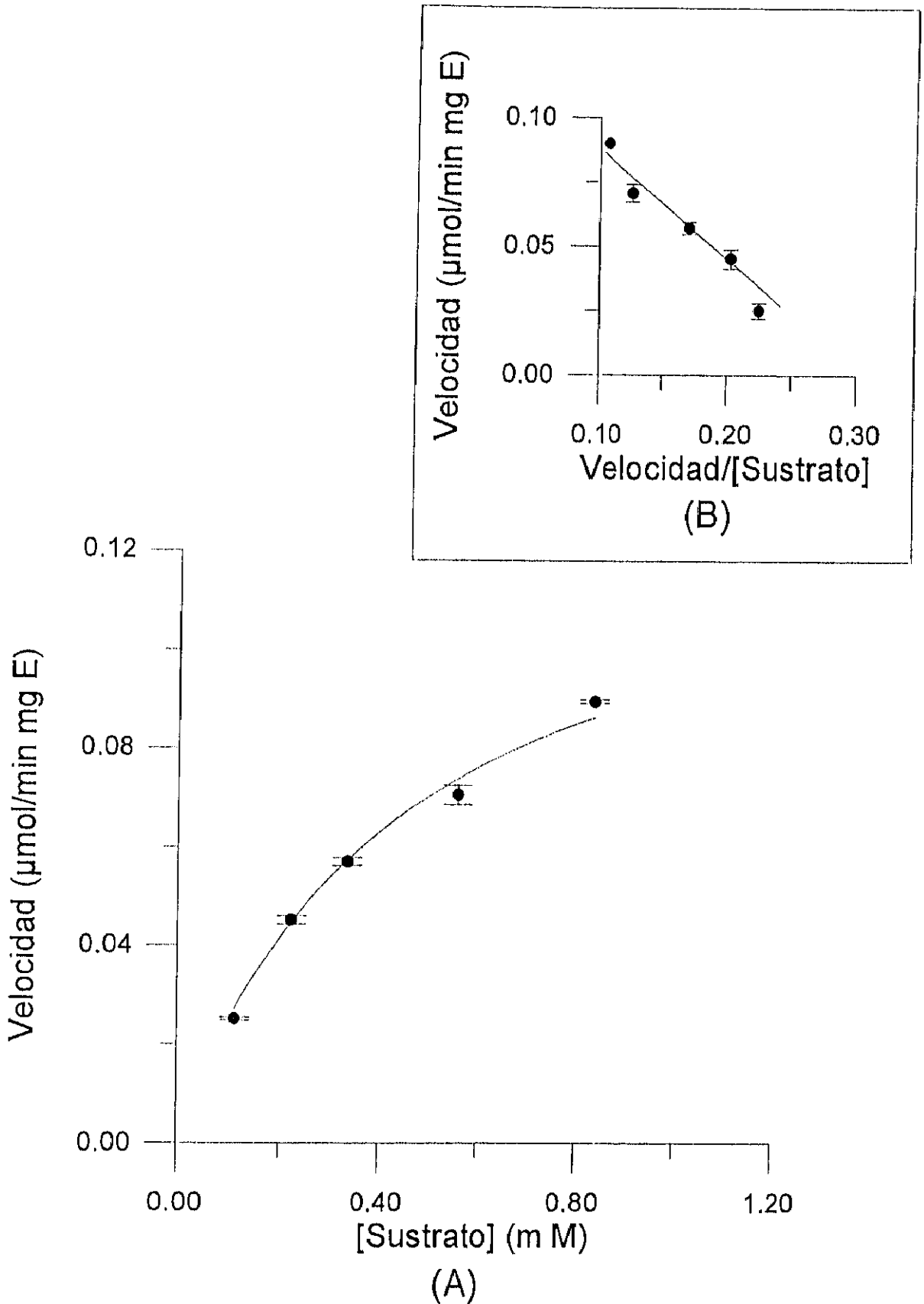


Tabla 63. Trioleína. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los sustratos sin alterar, y después de someterse a calentamiento a 180° C.

Horas de calentamiento	Km ^{ap} (mM)·10	Vmax ^{ap} (μmol/min mg E)·10 ³	Vmax ^{ap} /Km ^{ap} (μmol min ⁻¹ mg E ⁻¹ /mM)·10
0	1,2 ± 0,2	49,6 ± 2,1	4,2
1	2,3 ± 0,3	79,1 ± 3,0	3,4
2	2,3 ± 0,4	93,5 ± 5,3	4,1

Tabla 64. 1,3 dioleína. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los sustratos sin alterar, y después de someterse a calentamiento a 180° C.

Horas de calentamiento	Km ^{ap} (mM)·10	Vmax ^{ap} (μmol/min mg E)·10 ³	Vmax ^{ap} /Km ^{ap} (μmol min ⁻¹ mg E ⁻¹ / mM)·10
0	1,2 ± 0,2	50,1 ± 2,4	4,2
1	4,3 ± 0,5	131 ± 7	3,1

En ambos casos, el tratamiento térmico aumentó ligeramente la Vmax^{ap} y la Km^{ap}, siendo mucho más apreciable este efecto en la 1,3 dioleína. El aumento simultáneo en ambos parámetros compensa la relación entre ellos, proporcionando valores de las constantes de especificidad (Vmax^{ap} / Km^{ap}) muy semejantes entre los dos sustratos y observándose en ambos casos una variación importante de la relación Vmax^{ap} / Km^{ap} con el proceso de calentamiento. El que la constante de especificidad no haya experimentado grandes cambios frente a los sustratos sometidos a calentamiento, podría interpretarse en términos de que, si

bien parece que el tratamiento térmico modifica la naturaleza del sustrato y por tanto influye ligeramente en la capacidad catalítica de la enzima (V_{max}^{ap}) y en la afinidad por el sustrato (K_m^{ap}), existe un efecto compensatorio en ambos parámetros que hace que la especificidad efectiva frente a ambos sustratos no se vea prácticamente modificada por el calentamiento. Si esta tendencia se confirmara con otros sustratos y otros márgenes de calentamiento, podría especularse que *in vivo* las lipasas no variarían mucho su comportamiento de especificidad por sustrato, aunque estos sustratos hubieran sido recalentados, manteniendo así su papel concreto en la lipólisis. Esta hipótesis, obviamente, hace referencia a su especificidad, es decir a su selectividad en cuanto al reconocimiento de sustratos competidores, no a su velocidad de reacción, que según los datos de las tablas 63 y 64 sería mayor a altas concentraciones de sustrato (V_{max}^{ap}) en los sustratos recalentados. Dado que no puede admitirse desde el punto de vista químico ninguna alteración del grupo éster que facilite la hidrólisis, hemos de acudir a razones de índole física para explicar estos resultados.

En 1959, Stern y Roth, conjeturaron que en los aceites, como consecuencia de la fritura, podrían formarse compuestos con capacidad tensioactiva. Sin embargo, hasta 1986, no se aisló e identificó uno de estos productos (el oleato de sodio) en una fracción muy polar de una grasa de fritura (Blumenthal y Stockler, 1986). Si bien todo lo comentado anteriormente se refiere a fritura y no a calentamiento, Blumenthal en 1991 describió como agentes activos en superficie o surfactantes a los polímeros tanto térmicos de baja polaridad, como oxidados cuya polaridad es mayor. Dichos compuestos, como se ha podido comprobar a lo largo de esta Memoria, se forman durante el calentamiento de las grasas, independientemente de que este vaya acompañado de fritura.

Como se puede observar en las tablas 51 y 53 donde aparece la composición de las diferentes muestras de trioleína y 1,3 dioleína después de su calentamiento a 180°C, la cantidad de polímeros existentes en la muestra fue aumentando a medida que dichas sustancias se calentaron. De esta forma, la trioleína pasó a tener 2,90 y 15,9 mg de polímeros de triglicéridos/100 mg de muestra después de calentarse durante 1 y 2 horas respectivamente a 180°C y en presencia de aire.

Por otro lado, en la 1,3 dioleína se formaron 3,80 mg de polímeros de triglicéridos/100 g de muestra después de 1 hora de calentamiento en las mismas condiciones.

Según esto, en las muestras de trioleína y 1,3 dioleína cuando se calientan aparecen compuestos con carácter tensioactivo que podrían favorecer la emulsificación de dichos

aceites y producir por ello emulsiones más estables. Este hecho podría ser la explicación de que la V_{max}^{np} aumente con el calentamiento (la emulsión del sustrato sería mas accesible al proceso catalítico de la lipasa) y que la K_m^{np} aumente también (disminuye la afinidad por el sustrato posiblemente por la existencia de gotículas de mayor tamaño).

Una prueba indirecta de la mayor facilidad de dichas muestras para emulsificarse podría ser el hecho de que se produjera gran cantidad de espuma durante su proceso de emulsificación mediante ultrasonidos.

IV.3.2.2 Hidrólisis de aceites de origen vegetal.

IV.3.2.2.1 OLEÍNA DE PALMA.

La oleína de palma cruda y procedente de diferentes frituras de patatas fueron usadas como sustratos de la lipasa pancreática porcina.

La estimación de la concentración de sustrato emulsionado existente en el reactor se realizó a partir de los siguientes cálculos:

i) determinación del peso molecular promedio de las diferentes muestras de aceite empleadas. Dicho cálculo se realizó a partir de su composición porcentual en ácidos grasos.

Para ello, los porcentajes relativos de los diferentes ácidos grasos mayoritarios de cada muestra de oleína de palma procedente de diferentes frituras de patatas (tabla 35) se relativizaron con objeto de que su suma fuera 100.

A continuación, teniendo en cuenta la composición en ácidos grasos relativa a 100, los pesos moleculares de dichos ácidos grasos, el peso molecular del glicerol y el del H_2O que se libera al esterificarse, se calcularon los pesos moleculares de cada una de las muestras de oleína de palma de la siguiente forma:

Ejemplo: Cálculo del peso molecular de la oleína de palma procedente de 40 frituras de patatas. Su composición en ácidos grasos (tabla 35) se relativizó de siguiente forma (tabla 65):

Tabla 65. Composición porcentual en ácidos mayoritarios (mg/100 mg de ácidos grasos) y relativización posterior, de la oleína de palma utilizada 40 veces para freír patatas.

Composición	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Total
Porcentual	1,1±0,1	38,1±0,3	3,9±0,1	44,4±0,2	9,6±0,1	97,2
Relativizada	1,2±0,1	39,2±0,1	4,01±0,0	45,7±0,2	9,9±0,1	100

Los pesos moleculares de los ácidos grasos mayoritarios que constituyen la oleína de palma son:

C14:0	228 g/mol
C16:0	256 g/mol
C18:0	284 g/mol
C18:1	282 g/mol
C18:2	280 g/mol
Glicerol	92 g/mol
H ₂ O	18 g/mol

$$92 + \left[\left(3 \times 228 \cdot \frac{1,16}{100} + 256 \cdot \frac{39,32}{100} + 284 \cdot \frac{4,07}{100} + \right. \right. \\ \left. \left. + 282 \cdot \frac{45,7}{100} + 280 \cdot \frac{9,85}{100} \right) \right] - (18 \times 3) = 851,2 \text{ g/mol}$$

De esta manera se obtuvieron los pesos moleculares promedios de la oleína de palma sin utilizar y sometida a diferentes frituras de patatas que aparecen en la tabla 66:

Tabla 66. Pesos moleculares promedio de la oleína de palma sin usar y usada en diferentes frituras repetidas de patatas.

Número de fritura	Peso molecular promedio (g/mol) ^a
0	851,6 ± 0,5
10	851,5 ± 0,3
20	851,6 ± 0,7
30	851,4 ± 0,3
40	851,2 ± 0,2
50	851,0 ± 0,1
60	850,9 ± 0,1
70	850,4 ± 0,1
90	850,0 ± 0,1

^a Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

ii) cuando se preparó la emulsión de cada uno de las muestras de oleína de palma, los volúmenes de dichos sustratos empleados se pesaron en cada caso con objeto de conocer exactamente la cantidad de aceite utilizada para preparar dicha emulsión.

Una vez conocida la cantidad exacta de aceite utilizada y su peso molecular se pudieron calcular las concentraciones de sustrato en el reactor a través de los diferentes volúmenes utilizados de emulsión en cada caso.

Los resultados obtenidos de velocidades iniciales de hidrólisis en función de la concentración del sustrato de la oleína de palma de partida y después de repetidas frituras de patatas se expresan en las tablas 67-75, donde aparece la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Tabla 67. Estudio cinético de la oleína de palma sin alterar frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,15	$42,8 \pm 0,4$	0,999
0,31	$64,7 \pm 4,5$	0,999
0,62	$94,4 \pm 9,3$	0,999
0,92	$106,5 \pm 3$	0,997
1,23	$112,7 \pm 4$	0,996
1,54	$123,3 \pm 4$	0,996
2,31	$137,2 \pm 7$	0,997

Tabla 68. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 10 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,15	$44,3 \pm 1,4$	0,999
0,31	$54,0 \pm 1,4$	0,999
0,61	$88,9 \pm 0,8$	0,999
0,92	$108,1 \pm 5$	0,998
1,23	$112,3 \pm 4,4$	0,999
1,54	$127,4 \pm 1$	0,998
2,30	156 ± 12	0,998

Tabla 69. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 20 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,16	$46,6 \pm 0,1$	0,997
0,31	$82,8 \pm 1,8$	0,999
0,63	108 ± 4	0,999
0,94	117 ± 4	0,999
1,26	$140,6 \pm 1,1$	0,999
1,57	163 ± 5	0,999
2,36	185 ± 6	0,996

Tabla 70. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 30 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,16	$46,0 \pm 4,0$	0,998
0,31	$67,8 \pm 0,3$	0,999
0,63	$88,1 \pm 4,8$	0,999
0,94	113 ± 1	0,996
1,25	117 ± 4	0,995
1,57	124 ± 1	0,995
2,35	143 ± 2	0,994

Tabla 71. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 40 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E} \cdot 10^3$)	r
0,16	$39,8 \pm 3,4$	0,996
0,31	$58,3 \pm 2,2$	0,999
0,63	86 ± 1	0,999
0,94	115 ± 2	0,999
1,26	111 ± 1	0,999
1,57	108 ± 1	0,999
2,36	124 ± 1	0,999

Tabla 72. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 50 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E} \cdot 10^3$)	r
0,15	$39,2 \pm 0,9$	0,997
0,31	$52,1 \pm 0,2$	0,998
0,62	$71,7 \pm 1,0$	0,999
0,92	$72,9 \pm 3,3$	0,999
1,23	$81,6 \pm 0,7$	0,998
1,54	$94,8 \pm 2,4$	0,998
2,31	$99,1 \pm 5,1$	0,999

Tabla 73. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 60 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,15	$38,3 \pm 1,1$	0,997
0,31	$45,0 \pm 2,9$	0,999
0,62	$75,8 \pm 1,8$	0,999
0,93	$95,9 \pm 6,0$	0,996
1,24	113 ± 7	0,999
1,54	116 ± 3	0,998
2,32	119 ± 1	0,999

Tabla 74. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 70 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,15	$45,6 \pm 0,1$	0,995
0,31	$57,3 \pm 2,0$	0,998
0,62	$72,7 \pm 0,1$	0,999
0,92	$75,9 \pm 2,0$	0,999
1,23	$91,1 \pm 1,4$	0,999
1,54	$96,4 \pm 0,1$	0,999
2,31	117 ± 1	0,999

Tabla 75. Estudio cinético de la oleína de palma utilizada para realizar 90 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E} \cdot 10^3$)	r
0,16	$50,2 \pm 0,5$	0,996
0,32	$75,2 \pm 4,0$	0,999
0,63	117 ± 2	0,999
0,95	145 ± 20	0,999
1,24	150 ± 14	0,999
1,58	158 ± 3	0,999
2,37	180 ± 4	0,997

Como en el caso de las sustancias patrón, el número de frituras -equivalente al proceso de termooxidación sufrido por aquellas- no alteraría el comportamiento michaeliano de la hidrólisis como se aprecia en las representaciones correspondientes a la oleína de palma sin usar y usada 40 y 90 veces respectivamente para freír patatas (figuras 76, 77 y 78), y como se comprobó numericamente con los ajustes de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten y su estadística asociada. De hecho las líneas de trazo continuo que aparecen en estas figuras corresponden a dichos ajustes, observándose una buena concordancia entre la tendencia de los puntos y la línea ajustada.

Cuando se analizaron los datos de K_m^{np} y V_{max}^{np} obtenidos, los datos aparecen en la tabla 76.

Se puede ver que K_m^{np} y V_{max}^{np} se mantuvieron prácticamente constantes con el número de frituras, lo mismo que ocurrió obviamente con las constantes de especificidad (V_{max}^{np} / K_m^{np}).

Figura 76.- Oleína de palma.

(A) Representación gráfica (v - $[S]$)

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

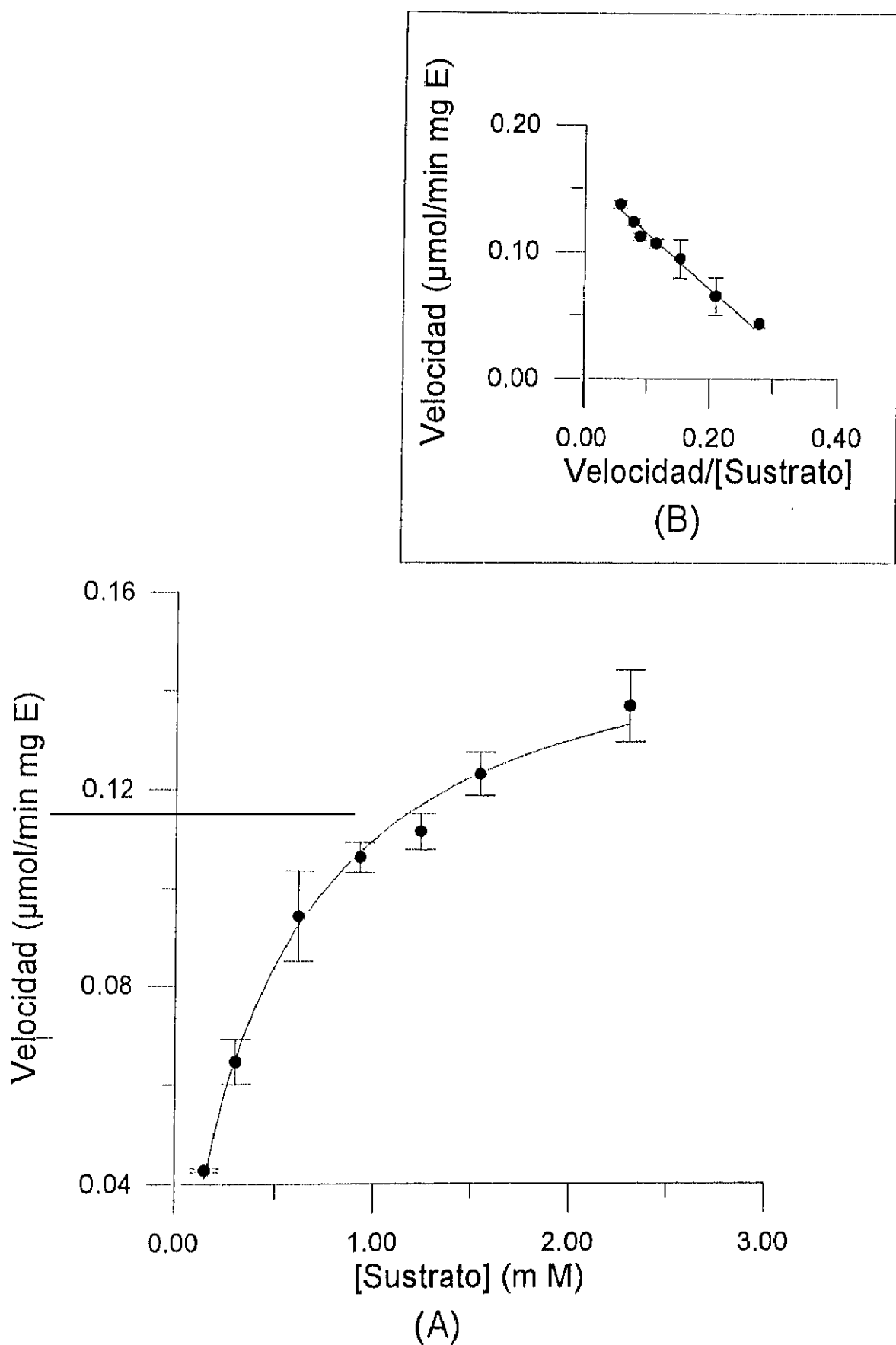


Figura 77.- Oleína de palma usada 40 veces para freír patatas.

- (A) Representación gráfica (v - $[S]$)
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

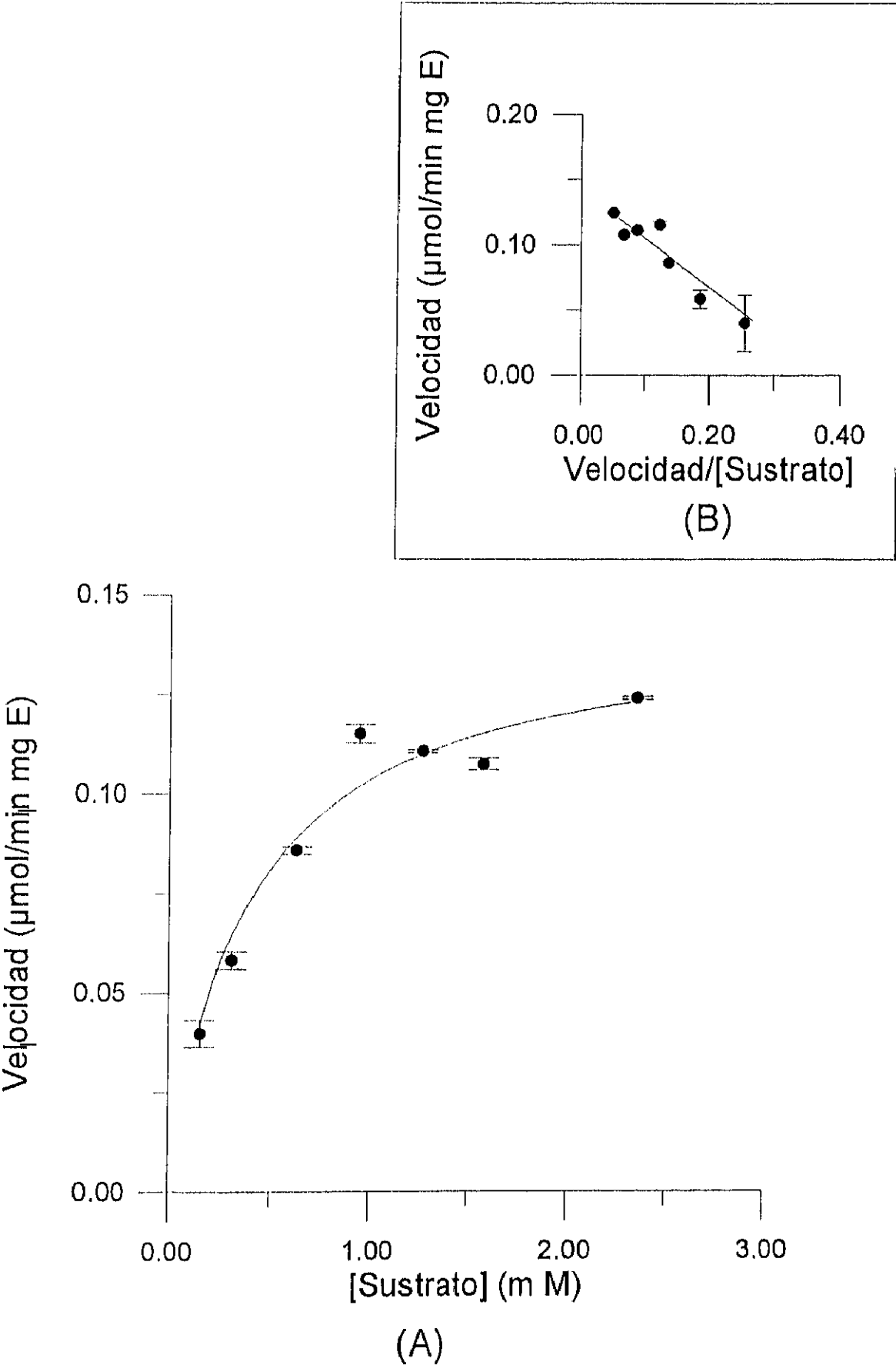


Figura 78.- Oleína de palma usada 90 veces para freir patatas.

- (A) Representación gráfica (v - $[S]$)
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

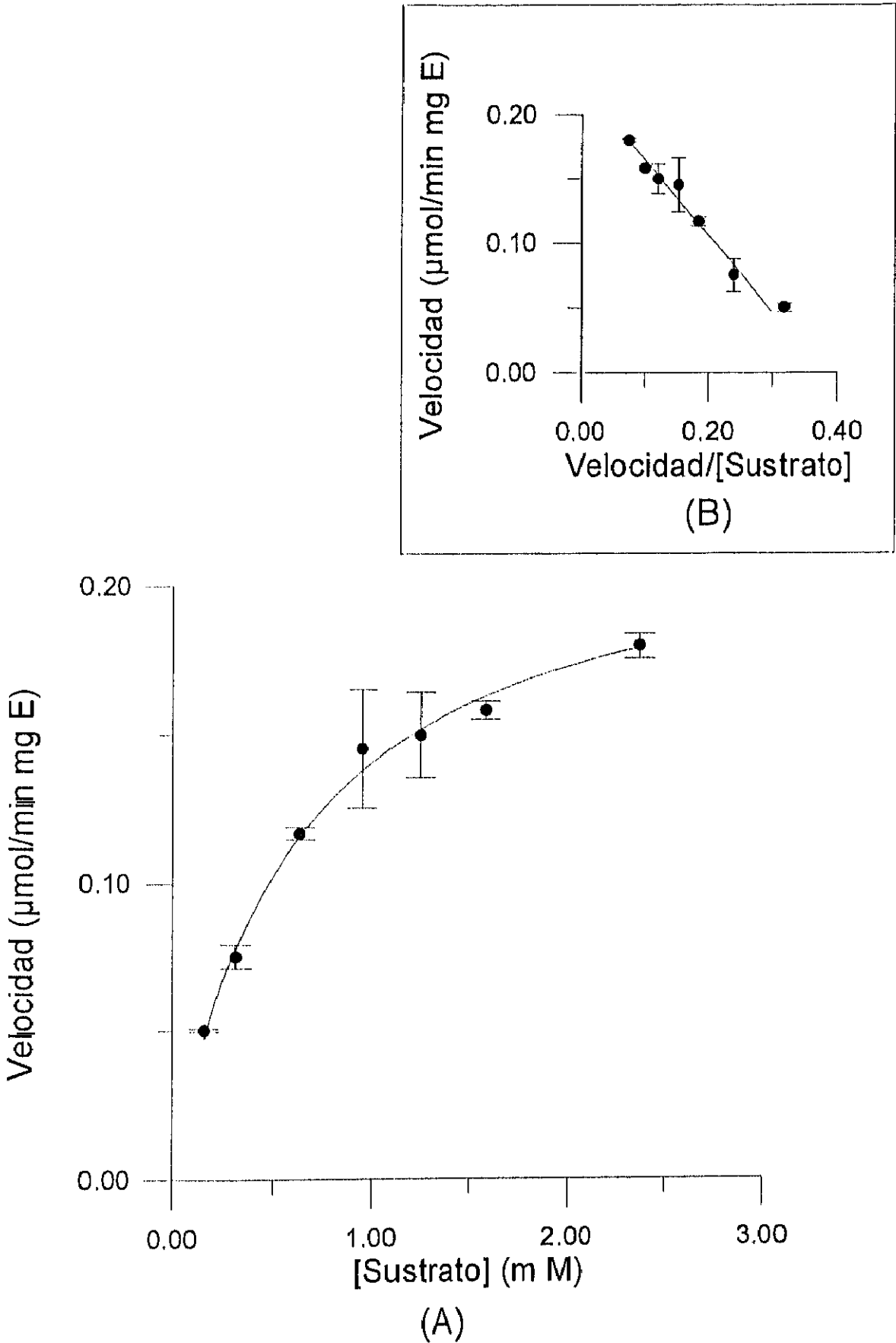


Tabla 76. Oleína de palma. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los diferentes sustratos sin alterar, y procedentes de sucesivas frituras de patatas.

Nº de fritura	Km ^{ap} (mM)·10	Vmax ^{ap} (μmol/min mg E)·10 ³	Vmax ^{ap} /Km ^{ap} (μmol min ⁻¹ mg E ⁻¹ / mM)·10
0	4,4 ± 0,6	159 ± 6,5	3,6
10	6,9 ± 1,2	193 ± 12	2,8
20	6,5 ± 1,1	224 ± 13	3,5
30	4,9 ± 0,5	167 ± 6	3,4
40	3,8 ± 0,6	143 ± 6	3,8
50	3,4 ± 0,5	109 ± 5	3,2
60	6,2 ± 1,0	158 ± 10	2,6
70	4,0 ± 0,8	124 ± 8	3,1
90	5,9 ± 1,0	224 ± 14	3,8

Según estos resultados, la lipasa pancreática hidrolizaría las diferentes muestras de oleína de palma sin alterar y con diferente grado de alteración de forma semejante.

Cuando se compara la composición de las diferentes muestras de oleína de palma sin usar y después de utilizarse en frituras repetidas de patatas, puede observarse que:

i) en cuanto a su composición en triglicéridos sin modificar que serían los sustratos naturales de la lipasa pancreática (tabla 33), se pasó de 90,7 a 73,6 mg/100 mg de muestra desde la oleína de palma sin usar y la procedente de 90 frituras de patatas respectivamente. La disminución por ello del contenido de triglicéridos sin alterar entre una muestra y otra fue de ≈ 19%.

ii) el contenido en los diferentes compuestos específicos de la alteración termooxidativa aumentó (tabla 39) y así, los polímeros de triglicéridos pasaron de 0,1 a 3,7 mg/100 mg de muestra, los dímeros de triglicéridos de 1,0 a 7,9 mg/100 mg de muestra y

los triglicéridos oxidados de 1,1 a 8,3 mg/100 mg de muestra entre la oleína de palma sin usar y la procedente de 90 frituras respectivamente.

Dichos compuestos, según la bibliografía (Henderson y col., 1993; Márquez-Ruiz y col., 1992a; Miyashita y col., 1990; Yoshida y Alexander, 1983) y según hemos confirmado nosotros en un estudio que se presenta posteriormente en la presente Memoria (apartado IV.4) pueden ser hidrolizados por la lipasa pancreática.

Algunos autores como Henderson y col. (1993) opinan que los polímeros de triglicéridos formados durante la autooxidación de los aceites de pescado son hidrolizados por la lipasa pancreática porcina. Dichos autores incubaron lipasa pancreática porcina con aceites con diferente contenido en polímeros de triglicéridos que iba desde $< 4\%$ hasta el 30% , en las mismas condiciones de ensayo. Después de analizar los productos de la lipólisis comprobaron que, en todos los casos, los triglicéridos se hidrolizaron de forma similar a los polímeros de triglicéridos y, mientras que, en las muestras con bajo contenido en polímeros ($< 4\%$), la hidrólisis fue total y los productos mayoritarios fueron ácidos grasos libres y monoglicéridos, cuando el contenido en polímeros de triglicéridos era muy elevado (30%), la hidrólisis de la muestra no fue tan eficaz y se detectaron dímeros de ácidos grasos como productos de la hidrólisis.

Miyashita y col. (1990) estudiaron la hidrólisis de triglicéridos con restos acilo de palmítico, linoleico y linolénico en posiciones conocidas, así como sus monohidroperóxidos obtenidos por autooxidación a 50°C en la oscuridad, llevada a cabo por la lipasa pancreática porcina *in vitro*. En dicho estudio, se comprobó que dicha enzima no se inactivaba por la presencia de monohidroperóxidos en el medio y no sólo eso, sino que la lipasa pancreática porcina hidrolizaba preferentemente los ácidos grasos monohidroperóxidos en lugar de los ácidos grasos sin oxidar situados en la misma posición del triglicérido. Esta mayor susceptibilidad de los restos acilo con grupos hidroperóxidos en su molécula a ser hidrolizados por la lipasa pancreática porcina se debió, según dichos autores (Miyashita y col., 1990), a su estructura molecular y propiedades hidrofílicas.

Por el contrario, otros autores como Yoshida y Alexander (1983) defienden que el grado de hidrólisis enzimática de las diferentes fracciones de acilglicéridos existentes en una muestra de grasa se produce de forma diferente dependiendo de la alteración termooxidativa de dicha muestra y de la cantidad de compuestos polares en los productos. Dichos autores calentaron diferentes aceites como girasol, soja y trigo a diferentes tiempos y,

posteriormente, los fraccionaron mediante cromatografía en columna, dependiendo de su polaridad, en compuestos monoméricos, diméricos y oligoméricos.

Mediante la hidrólisis posterior de dichas fracciones con lipasa pancreática comprobaron que:

i) los monómeros se hidrolizaron tan rápidamente como los correspondientes aceites sin alterar.

ii) los dímeros se hidrolizaron escasamente.

iii) los oligómeros apenas se hidrolizaron.

Asimismo observaron que, a medida que aumentaba el tiempo de calentamiento, se produjo una disminución de la hidrólisis de los dímeros.

Márquez-Ruiz y col. (1992a) utilizando un aceite de oliva crudo y calentado a 180°C como sustrato de la lipasa pancreática porcina demostraron que la velocidad de hidrólisis enzimática, dependía del peso molecular de los glicéridos, siendo menor a medida que el peso molecular de los compuestos alterados existentes en la grasa aumentaba.

Otros autores como Legier y col. (1994) trabajando con lipasas de levaduras (*Candida cylindracea*), de origen fúngico (*Rhizopus arrhizus*, *Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum*) y utilizando como sustrato aceite de girasol calentado a 205°C, con un 46% de glicéridos polimerizados, demostraron que dichas lipasas son capaces de hidrolizar, en mayor o menor grado dependiendo de su naturaleza, a los triglicéridos polímeros. Así pues el origen de la lipasa condiciona en gran medida su quimioselectividad.

Después de lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que la lipasa pancreática porcina es capaz de hidrolizar, en mayor o menor medida, compuestos diferentes de los que en un principio serían sus sustratos naturales, los triglicéridos no modificados. Este hecho, demostrado en estudios *in vitro*, viene a confirmar lo que sucede cuando se estudian organismos vivos, donde se produce una absorción en mayor o menor medida de los diferentes compuestos originados en las grasas como consecuencia de su calentamiento (Combe, 1978; Márquez-Ruiz y col., 1992b), a pesar de las reservas con las que se debe contemplar la comparación de lo que sucede en un organismo vivo con los resultados obtenidos *in vitro* (Chen y col., 1990).

Por otro lado, como consecuencia de la fritura de alimentos, aparecen en los aceites sustancias con carácter humectante o surfactante que actúan a nivel de superficie disminuyendo la tensión interfacial (Blumenthal, 1991). La presencia de surfactantes entre los que se incluyen los polímeros (como ya se ha explicado anteriormente, apartado IV.3.2.1.2) podría favorecer la emulsificación de los sustratos, con lo que se obtendrían emulsiones más estables y con características fisicoquímicas diferentes a medida que aumenta el grado de polimerización en la muestra.

La cantidad de polímeros existentes en la oleína de palma, como ya se ha dicho anteriormente, pasó de 0,1 a 3,7 mg/100 mg de muestra entre la oleína de partida y la utilizada en 90 frituras de patatas.

Con objeto de determinar si las pequeñas variaciones observadas en los valores de K_m^{np} y V_{max}^{np} (tabla 76) obtenidos por nosotros se debían a una relación causa efecto o, por el contrario, respondían a una distribución normal de datos experimentales perturbados por el azar experimental, se llevó a cabo el análisis de dichos valores mediante el programa NORMAL del paquete SIMFIT (Bardsley, 1992). Los tests de normalidad aplicados por este programa tanto a los valores de K_m^{np} como de V_{max}^{np} , nos confirmaron, en efecto, que las diferencias observadas eran fruto únicamente del azar experimental. Por tanto se puede concluir que los valores de K_m^{np} y V_{max}^{np} responden a una distribución normal, debiéndose las diferencias observadas únicamente al azar, sin que parezca existir una relación causa-efecto entre las sucesivas frituras de la oleína de palma y su especificidad como sustrato respecto a la lipasa pancreática porcina.

Este resultado no estaría en concordancia con la dependencia observada entre los parámetros V_{max}^{np} y K_m^{np} y el calentamiento para los sustratos puros trioleína y 1,3 dioleína (ya comentado en el apartado IV.3.2.1.2). La interpretación para esta diferencia de comportamiento podría residir en que la oleína de palma es una mezcla compleja.

Los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos característicos de la hidrólisis enzimática, así como la poca variación existente entre el contenido de unas muestras y otras de triglicéridos no alterados (19% entre el crudo y el frito 90 veces) y la gran complejidad que presentan las muestras de aceite como consecuencia de su utilización en frituras sucesivas por la aparición de cientos de compuestos diferentes, nos podrían hacer pensar que la similitud encontrada entre la hidrólisis de unas muestras y otras se podría deber a efectos compensatorios entre factores que podrían facilitar la hidrólisis y los que la podrían inhibir.

Este tipo de hechos no ocurren en el caso de los sustratos puros trioleína y 1,3 dioleína. Así pues, el número de frituras no altera la susceptibilidad de la grasa a ser hidrolizada por la lipasa pancreática porcina, *in vitro*.

IV.3.2.2.2 TRIGLICERIDOS NO POLARES DE LA OLEÍNA DE PALMA (TGOP).

La fracción de triglicéridos no polares de la oleína de palma antes y después de su calentamiento a 180°C en reactor abierto durante 1,2 y 4 horas, se utilizó como sustrato de la lipasa pancreática porcina.

Las concentraciones de sustrato en el reactor se calcularon de la misma forma que en la oleína de palma, a partir de su peso molecular calculado a partir de su composición porcentual en ácidos grasos (tabla 44). Los pesos moleculares de las diferentes muestras de TGOP utilizadas aparecen en la tabla 77.

Tabla 77. Peso molecular promedio de los TGOP antes y después de su calentamiento a 180°C.

Calentamiento (h)	Peso molecular promedio (g/mol) ^a
0	851,78 ± 0,23
1	849,75 ± 0,91
2	848,28 ± 0,28
4	840,89 ± 1,81

^a Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Los resultados obtenidos de velocidad inicial de reacción en función de la cantidad de sustrato existente en el medio aparecen a continuación en las tablas 78, 79, 80 y 81. Los valores indican la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Tabla 78. Estudio cinético de los **triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP)** frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,08	$23,1 \pm 1,3$	0,994
0,16	$41,1 \pm 1,4$	0,999
0,32	$56,5 \pm 0,2$	0,998
0,48	$68,6 \pm 2,9$	0,998
0,64	$71,9 \pm 0,7$	0,994
0,80	$86,1 \pm 1,2$	0,994
1,20	$93,0 \pm 4,2$	0,991

Tabla 79. Estudio cinético de los **TGOP calentados durante 1 hora a 180°C** frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,08	$37,8 \pm 1,8$	0,998
0,16	$47,4 \pm 1,5$	0,998
0,31	$68,9 \pm 1,7$	0,999
0,47	$77,9 \pm 1,7$	0,999
0,63	$84,8 \pm 0,4$	0,999
0,79	$87,3 \pm 0,4$	0,998
1,18	$93,2 \pm 2,5$	0,998

Tabla 80. Estudio cinético de los **TGOP** calentados durante **2 horas** a **180°C** frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,08	$37,4 \pm 4,4$	0,999
0,16	$47,0 \pm 0,6$	0,999
0,32	$56,7 \pm 0,3$	0,998
0,48	$69,4 \pm 1,5$	0,996
0,64	$72,2 \pm 0,7$	0,998
0,80	$78,2 \pm 0,5$	0,994
1,20	$81,4 \pm 1,3$	0,995

Tabla 81. Estudio cinético de los **TGOP** calentados durante **4 horas** a **180°C** frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,08	$17,5 \pm 4,9$	0,997
0,16	$29,4 \pm 4,4$	0,999
0,32	$49,9 \pm 0,5$	0,999
0,49	$53,0 \pm 1,1$	0,999
0,65	$60,8 \pm 1,1$	0,999
0,81	$60,8 \pm 1,7$	0,999
1,21	$76,7 \pm 2,1$	0,999

Como en los casos anteriores, la termooxidación de las muestras no alteró el comportamiento michaeliano del proceso cinético, como se puede observar en las figuras siguientes que corresponden a los TGOP sin alterar (figura 79) y después de 4 horas de calentamiento a 180°C (figura 80).

Con respecto a los parámetros cinéticos obtenidos que aparecen en la tabla 82, se puede observar que no existe una tendencia sistemática en cuanto a su aumento o disminución, mas bien parece observarse una fluctuación al azar, por lo que se podía concluir que la hidrólisis de los TGOP no se modifica por la alteración de las muestras producida por calentamiento a 180°C.

Tabla 82. Triglicéridos no polares de la oleína de palma. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los sustratos sin alterar, y después de someterse a calentamiento a 180° C.

Horas de calentamiento	Km^{ap} (mM)·10	Vmax^{ap} (μmol/min mg E)·10³	Vmax^{ap}/Km^{ap} (μmol min⁻¹ mg E⁻¹/ mM)·10
0	3,2 ± 0,4	115,6 ± 4,83	3,63
1	1,8 ± 0,1	107,6 ± 2,51	6,00
2	1,4 ± 0,2	89,91 ± 2,86	6,43
4	3,4 ± 0,6	93,84 ± 6,00	2,76

Esta no dependencia entre los parámetros cinéticos y el tiempo de calentamiento a que ha sido sometido el sustrato, coincidiría con lo observado en la oleína de palma y el número de frituras. Por tanto, la interpretación podría ser análoga y se basaría en el caracter de mezcla que tiene también la fracción de triglicéridos no polares de la oleína de palma.

Figura 79.- Triglicéridos no polares de la oleína de palma (TGOP).

- (A) Representación gráfica (v-[S])
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v-v/[S]).

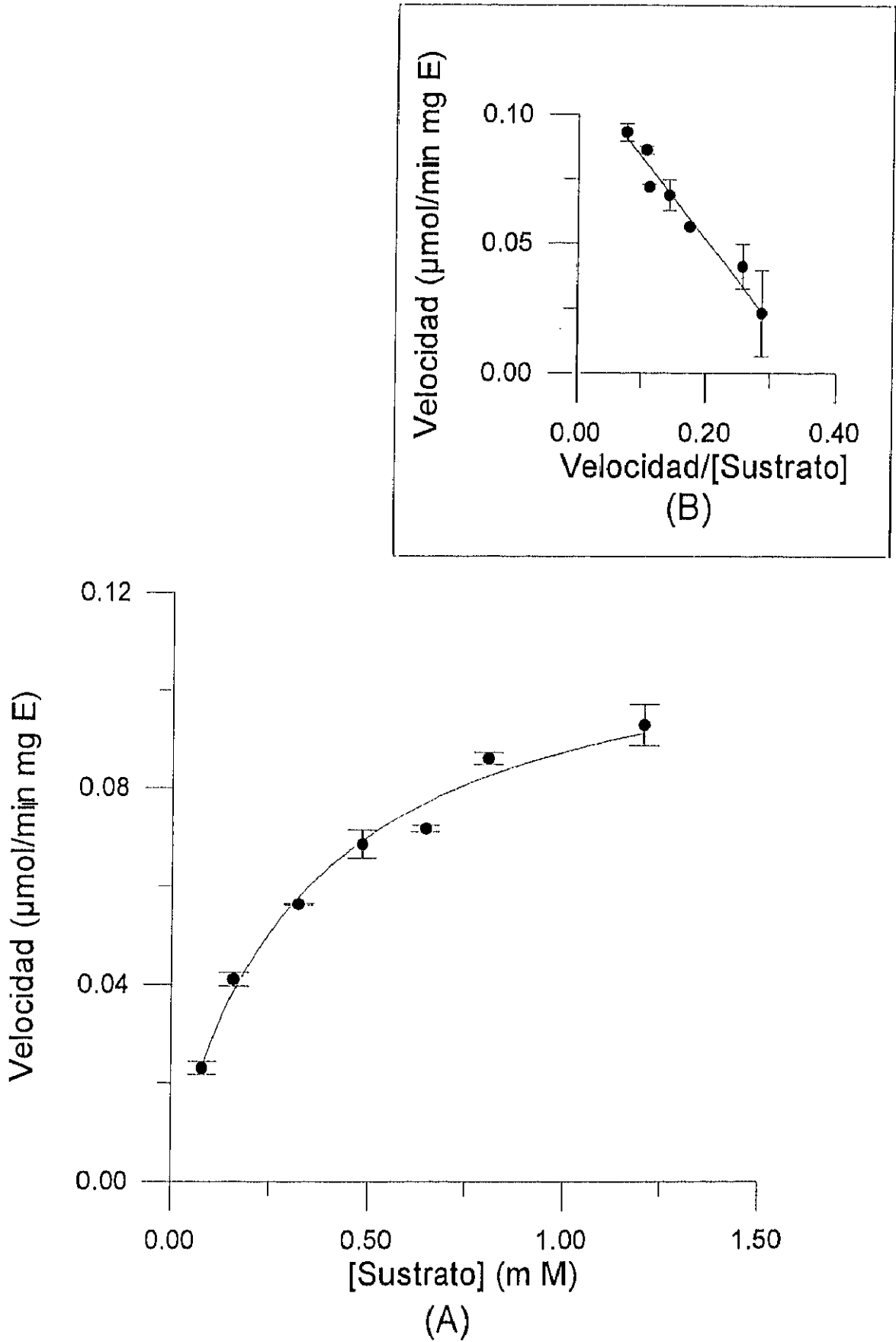
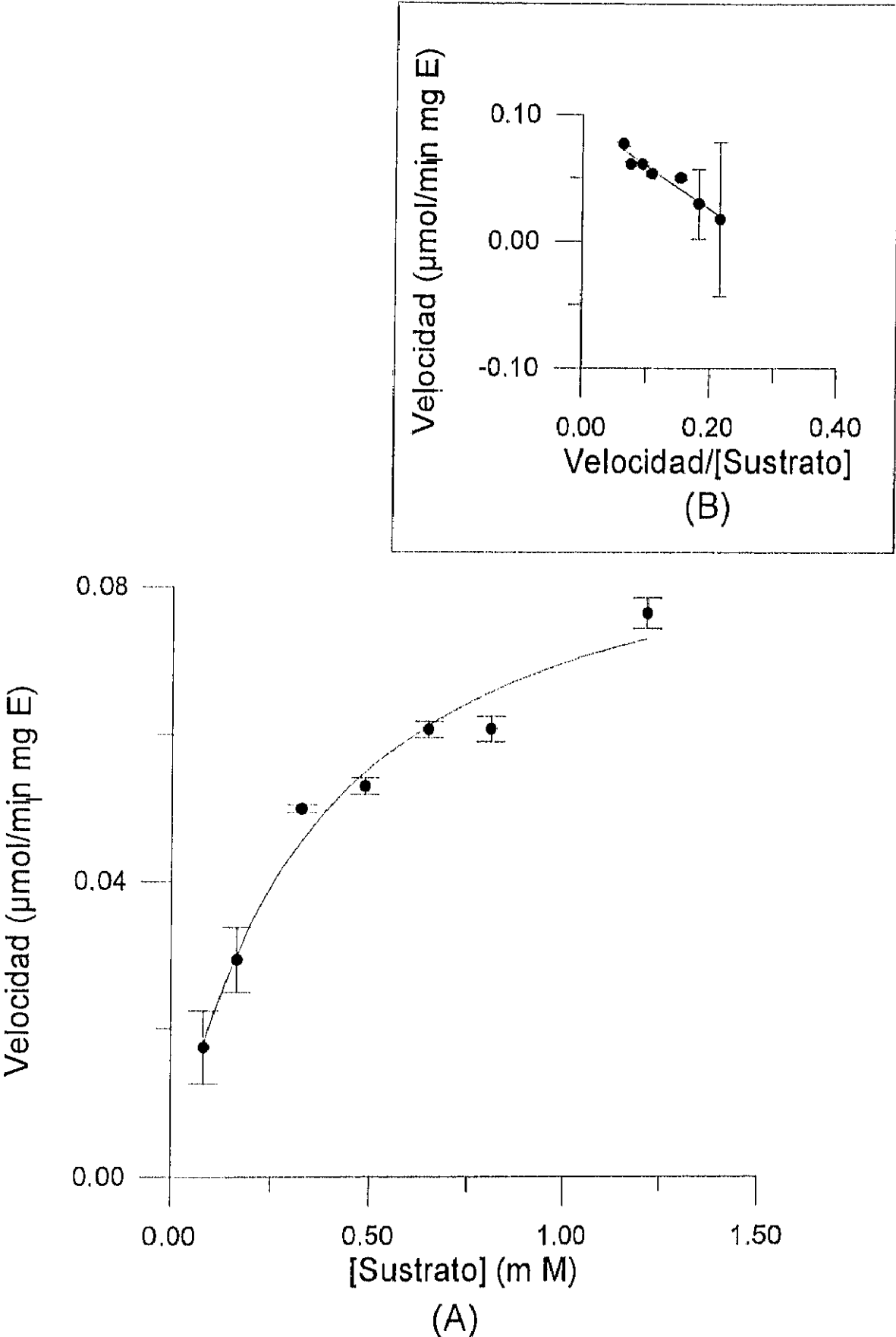


Figura 80.- TGOP calentados 4 horas a 180°C.

(A) Representación gráfica (v -[S])

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).



IV.3.2.2.3 ACEITE DE GIRASOL.

Un estudio paralelo se realizó con el aceite de girasol sin usar y procedente de 30 y 60 frituras de patatas.

Las concentraciones de sustrato en el reactor se calcularon igual que para los sustratos anteriores a partir de su peso molecular y conociendo la cantidad exacta de aceite utilizado en la emulsión. Los pesos moleculares promedio se obtuvieron de la composición porcentual en ácidos grasos de dicho aceite (tabla 15). Dichos pesos moleculares aparecen en la tabla 83.

Tabla 83. Peso molecular promedio del aceite de girasol de partida y del procedente de 30 y 60 frituras de patatas.

Nº de fritura	Peso molecular promedio (g/mol) ^a
0	875,49 ± 0,11
30	876,12 ± 1,51
60	876,15 ± 0,90

^a Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Los resultados obtenidos de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato empleada aparecen en las tablas 84, 85 y 86 para el aceite de girasol crudo y frito 30 y 60 veces respectivamente. En las mismas, los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

Tabla 84. Estudio cinético del aceite de girasol sin usar frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,15	$27,6 \pm 0,8$	0,995
0,30	$36,3 \pm 1,3$	0,995
0,60	$42,3 \pm 0,4$	0,996
0,91	$48,1 \pm 0,5$	0,998
1,21	$54,6 \pm 2,4$	0,998
1,51	$56,3 \pm 1,1$	0,997

Tabla 85. Estudio cinético del aceite de girasol utilizado para realizar 30 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,16	$33,1 \pm 1,5$	0,994
0,31	$42,6 \pm 1,6$	0,996
0,62	$58,1 \pm 0,5$	0,999
0,94	$71,0 \pm 1,7$	0,999
1,25	$75,3 \pm 0,3$	0,999
1,56	$79,5 \pm 1,7$	0,999
2,34	$89,0 \pm 1,5$	0,999

Tabla 86. Estudio cinético del aceite de girasol utilizado para realizar 60 frituras de patatas frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min mg E}) \cdot 10^3$	r
0,16	$32,5 \pm 0,7$	0,994
0,31	$40,9 \pm 0,1$	0,996
0,63	$51,9 \pm 1,1$	0,999
0,94	$61,7 \pm 0,7$	0,999
1,26	$63,1 \pm 4,7$	0,999
1,57	$60,1 \pm 0,1$	0,999
2,35	$75,8 \pm 1,0$	0,999

Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que, como ha venido ocurriendo en el resto de los sustratos, la hidrólisis del aceite de girasol por acción de la lipasa pancreática porcina respondió a un modelo cinético de Michaelis-Menten, comportamiento que no se vio modificado por el hecho de que las muestras estuvieran alteradas como consecuencia de la fritura de patatas. Esto se demuestra en las figuras correspondientes a la hidrólisis del aceite de girasol sin usar (figura 81) y procedente de 60 frituras de patatas (figura 82).

De los valores cinéticos expresados en la tabla 87, se podrían sacar conclusiones análogas a las obtenidas en la oleína de palma y en sus triglicéridos no polares, ya que K_m^{ap} y $V_{\text{max}}^{\text{ap}}$, al igual que en dichos sustratos, pueden considerarse constantes, ya que no se observa una tendencia sistemática sino pequeñas variaciones al azar de tipo experimental.

Figura 81.- Aceite de girasol.

(A) Representación gráfica (v - $[S]$)

(B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

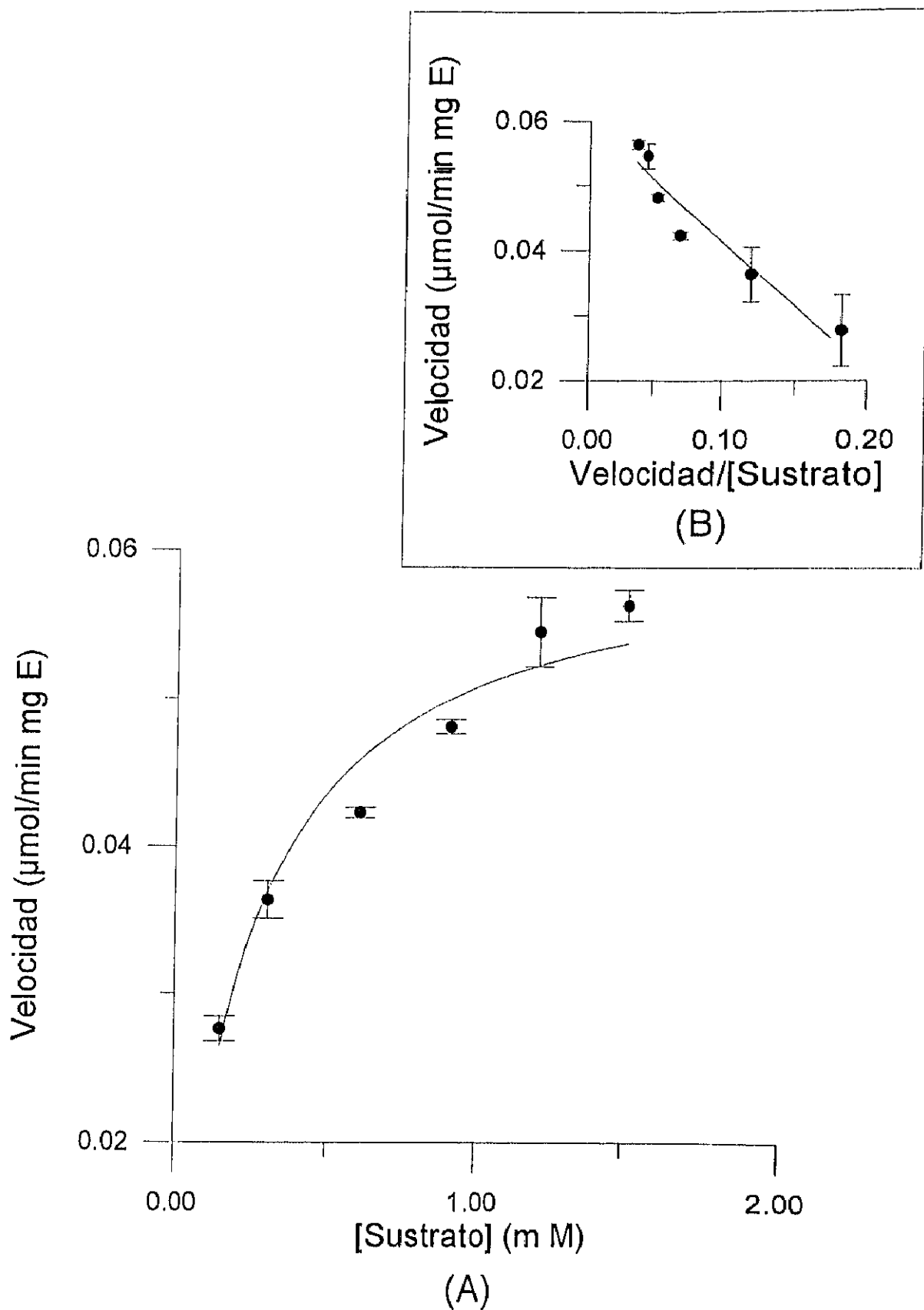


Figura 82.- Aceite de girasol usado 60 veces para freir patatas

- (A) Representación gráfica (v - $[S]$)
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

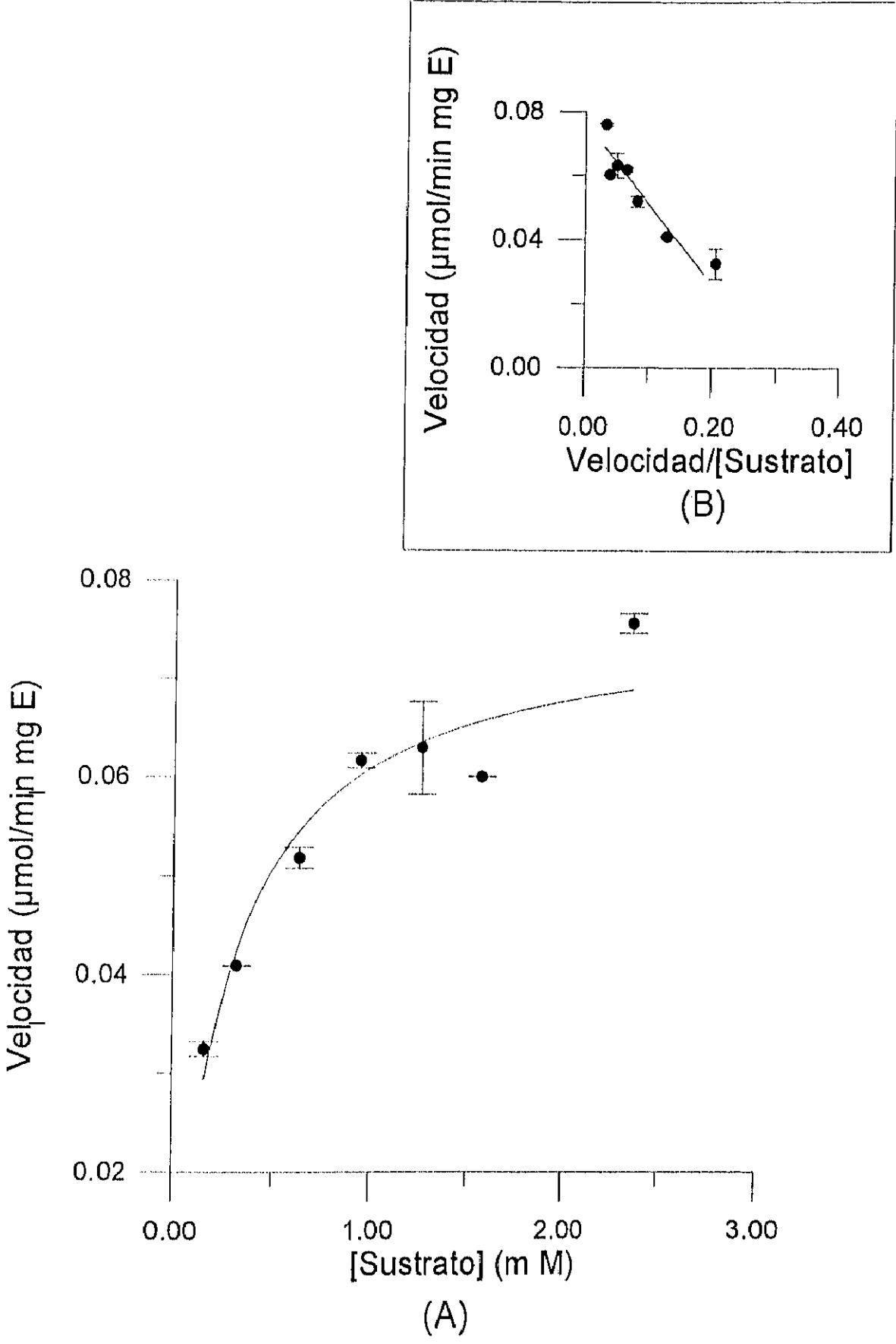


Tabla 87. Aceite de girasol. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los sustratos sin alterar, y procedentes de diferentes frituras de patatas.

Nº de fritura	Km ^{np} (mM)·10	Vmax ^{np} (μmol/min mg E)·10 ³	Vmax ^{np} /Km ^{np} (μmol min ⁻¹ mg E ⁻¹ / mM)·10
0	1,9 ± 0,3	60,8 ± 2,2	3,2
30	4,0 ± 0,4	101 ± 3	2,5
60	2,6 ± 0,4	77,1 ± 3	3,0

En cuanto a la composición de las diferentes muestras de aceite de girasol sin alterar y utilizado en frituras repetidas de patatas pudo observarse que:

i) la composición en triglicéridos no modificados (tabla 19) pasó de 95,95 a 72,31 mg/100 mg de muestra entre el aceite de girasol sin usar y el frito 60 veces respectivamente. Según esto, después de 60 frituras de patatas, el 25% de los triglicéridos del aceite inicial de girasol se modificaron al menos en uno de sus restos acilo.

ii) en cuanto a su contenido en compuestos específicos de la alteración termooxidativa (tabla 24), los polímeros de triglicéridos pasaron de 0,07 a 5,47 mg/100 mg de muestra, los dímeros de triglicéridos de 0,54 a 11,07 mg/100 mg de muestra y los triglicéridos oxidados de 1,94 a 8,91 mg/100 mg de muestra entre el aceite de girasol sin usar y el utilizado 60 veces para freir patatas respectivamente.

IV.3.2.2.4 ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

Finalmente, y para completar la serie, se estudió la hidrólisis del aceite de oliva virgen catalizada por lipasa pancreática porcina.

Previamente, se llevó a cabo la caracterización de la muestra de aceite de oliva virgen utilizada en dichos ensayos . Los resultados de las determinaciones realizadas aparecen en la tabla 88.

Tabla 88. Aceite de oliva virgen. Características físico-químicas y composición.

Índice de refracción	$1,47 \pm 0,01$
Índice de acidez	$0,679 \pm 0,002$
Composición en ácidos grasos(*):	
C16:0	$8,03 \pm 0,09$
C18:0	$2,55 \pm 0,02$
C18:1	$83,3 \pm 0,76$
C18:2	$4,40 \pm 0,12$
Triglicéridos no polares (**)	$97,24 \pm 0,01$
Compuestos polares (**):	
Dímeros de triglicéridos	$0,03 \pm 0,005$
Triglicéridos oxidados	$0,56 \pm 0,02$
Diglicéridos	$1,67 \pm 0,04$
Ácidos grasos	$0,50 \pm 0,05$

(*): Valores expresados en mg/100 mg de ácidos grasos totales.

(**): Valores expresados en mg/100 mg de aceite.

Los valores corresponden, en todos los casos, a la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Su peso molecular promedio, calculado como en los otros aceites a partir de su composición porcentual en ácidos grasos (tabla 88), fue de $877,51 \pm 0,10$ g/mol. A partir de dicho valor se calculó la concentración de sustrato puesta en el reactor .

Los resultados de velocidad de reacción obtenida en función de la concentración de sustrato se muestran en la tabla 89.

Tabla 89. Estudio cinético del aceite de oliva virgen sin alterar frente a la lipasa pancreática porcina.

[Sustrato] (mM)	Velocidad (μmol/min mg E)·10 ³	r
0,15	23,7 ± 0,8	0,992
0,29	35,7 ± 1,0	0,996
0,59	47,5 ± 0,4	0,997
0,88	54,3 ± 1,5	0,998
1,18	63,0 ± 0,6	0,999
1,47	71,6 ± 0,1	0,999

Dichos resultados, como en los demás casos, se ajustaron bien a la ecuación de Michaelis-Menten (figura 83), obteniéndose los valores de:

$$\begin{aligned} K_m^{np} &= 4,64 \cdot 10^{-1} \pm 0,06 \cdot 10^{-1} \text{ mM} \\ V_{max}^{np} &= 88,8 \cdot 10^{-3} \pm 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ (}\mu\text{mol/min mg E)} \\ V_{max}^{np}/K_m^{np} &= 1,91 \cdot 10^{-1} \text{ (}\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg E}^{-1}/\text{mM)} \end{aligned}$$

IV.3.3 DISCUSION CONJUNTA.

IV.3.3.1 Muestras sin alterar.

En la tabla 90 aparecen recopilados los parámetros cinéticos característicos de la hidrólisis de cada uno de los sustratos sin alterar.

Figura 83.- Aceite de oliva virgen.

- (A) Representación gráfica (v -[S])
- (B) Representación de Eadie-Hofstee (v - $v/[S]$).

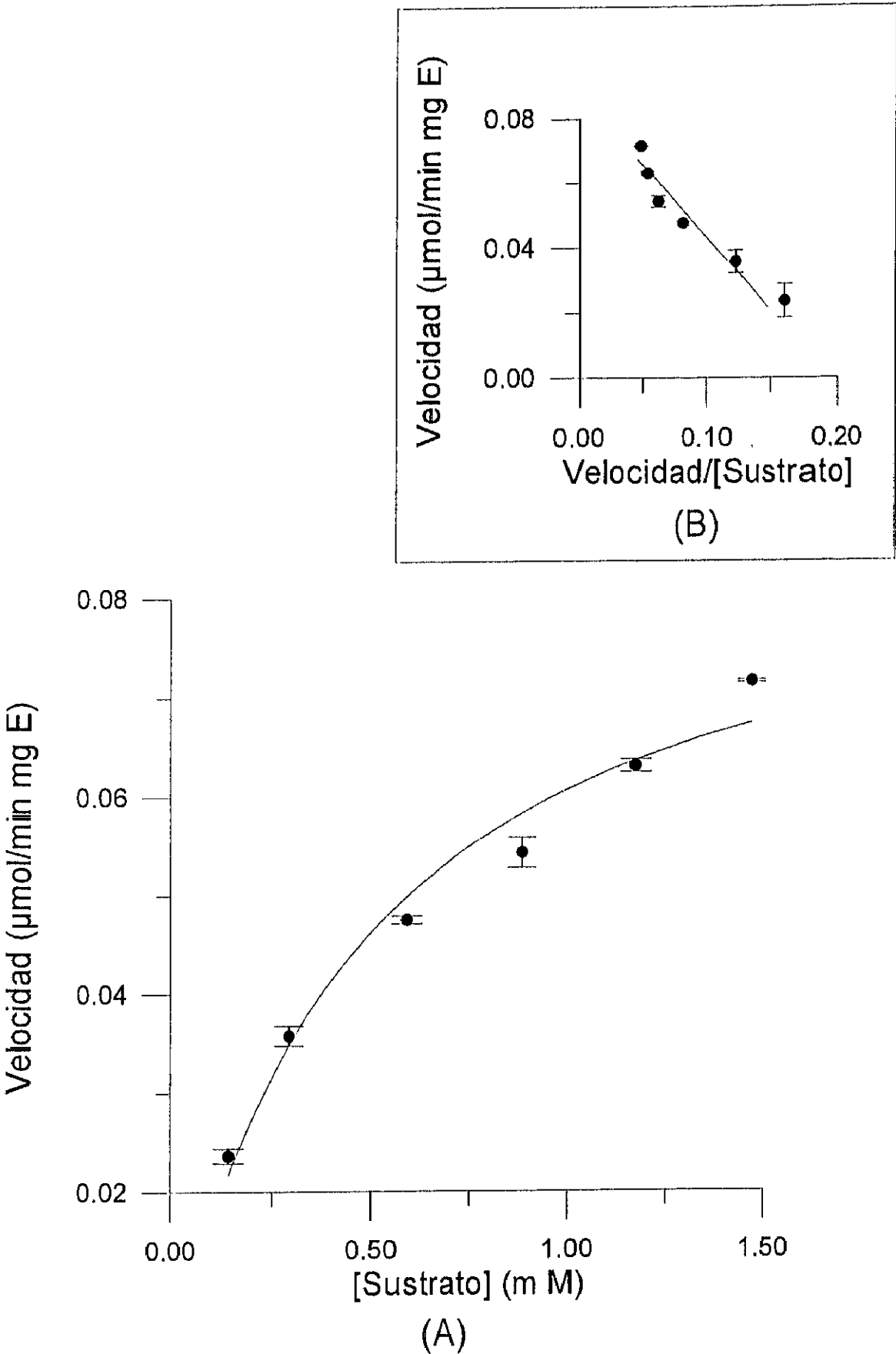


Tabla 90. Comparación de los parámetros cinéticos de los diferentes sustratos sin alterar:

Sustrato	K_m^{ap} (mM)·10	V_{max}^{ap} (μ mol/min mg E)·10 ³	V_{max}^{ap}/K_m^{ap} (μ mol min ⁻¹ mg E ⁻¹ / mM)·10
Trioleína	1,2 ± 0,2	49,6 ± 2,1	4,17
1,3 dioleína	1,2 ± 0,2	50,1 ± 2,4	4,17
Oleína de palma	4,4 ± 0,6	159 ± 6,5	3,61
TGOP	3,2 ± 0,4	116 ± 4,8	3,63
Accite de girasol	3,2 ± 0,4	60,8 ± 2,2	3,21
Accite de oliva virgen	4,6 ± 0,6	46,4 ± 6,4	1,91
Accite de oliva emulsionado (Sigma)	35 ± 7	96,3 ± 4,9	2,75

De los resultados que aparecen en la tabla 90 puede deducirse que:

i) La K_m^{ap} es similar tanto para las muestras puras como para los aceites vegetales, con la única excepción del aceite de oliva emulsionado Sigma, debido sin duda a que se trata de una emulsión comercial cuyo procedimiento de obtención no está declarado por la casa comercial y por tanto la naturaleza fisicoquímica de este sustrato no es comparable con la de los otros sustratos. Por otra parte, si comparamos los sustratos puros con los aceites, estos últimos presentan una K_m^{ap} aproximadamente tres veces mayor, posiblemente atribuible mas a la naturaleza fisicoquímica de las emulsiones que a la diferente naturaleza química de los lípidos a hidrolizar, ya que, como se ha descrito en los apartados III.3.1.4.1 y III.3.2.2, la preparación de las emulsiones fue ligeramente diferente en los dos casos, con independencia de la mayor facilidad natural que presentan los aceites vegetales a ser emulsionados. esta parece ser la causa de que los valores de K_m^{ap} se agrupen en torno a 0,12 mM para los lípidos puros y en torno a 0,35 mM para los aceites vegetales.

ii) La V_{max}^{np} de los lípidos puros trioleína y 1,3 dioleína es idéntica, lo que unido también a unos mismos valores de K_m^{np} , da como resultado que sus constantes de especificidad (V_{max}^{np}/K_m^{np}) sean idénticas. Este hecho significa que ambos sustratos son reconocidos por la enzima con idéntica actividad, lo que apuntaría en la dirección de que son los dos alcoholes primarios existentes en ambos sustratos los determinantes de la actividad enzimática, convirtiéndolos en dos buenos patrones de actividad lipásica, al margen de otros factores coadyuvantes de emulsificación que poseen los aceites vegetales.

iii) Por otra parte el mayor valor observado para la V_{max}^{np} fue con la oleína de palma, que resulta tres veces mayor que el de los patrones puros. En cuanto a los aceites de girasol y de oliva virgen, sus valores de V_{max}^{np} son comparables a los observados con los patrones y por tanto inferiores al presentado por la oleína de palma.

iv) De especial interés resultan, a la hora de de comparar la especificidad de la enzima por diferentes sustratos, los valores de las constantes de especificidad (V_{max}^{np}/K_m^{np}), ya que son estos valores los que realmente determinarían *in vivo* la discriminación de la lipasa pancreática entre sustratos competitivos, debido a que es el cociente entre V_{max}^{np} y K_m^{np} , y no los valores por separado, el que de una manera global reúne toda la información acerca del proceso enzimático (K_m^{np} en cuanto a la unión y V_{max}^{np} en cuanto a la catálisis).

En base a estos valores podría concluirse lo siguiente:

a) Los lípidos puros trioleína y 1,3 dioleína presentan la mayor especificidad frente a la lipasa pancreática porcina.

b) La oleína de palma, TGOP y el aceite de girasol presentarían especificidades semejantes frente a dicha enzima.

c) El aceite de oliva virgen presentaría una especificidad ligeramente inferior al resto de los sustratos ensayados.

d) Globalmente considerados, todos los sustratos analizados en este estudio presentan valores muy semejantes para sus constantes de especificidad, lo que se podría interpretar en términos de que la lipasa pancreática porcina, y posiblemente las lipasas en general, constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas con muy poca especificidad, de forma que, a la postre, basta con que existan enlaces ester con el glicerol para que la actividad enzimática se exprese con similar capacidad hidrolítica quedando "compensados", de alguna forma, el resto de factores que intervienen en la lipólisis, como es la naturaleza de la emulsión.

Obviamente esta hipótesis es una generalización y harían falta mas estudios para caracterizarla.

IV.3.3.2 Muestras calentadas.

Los valores de Km^{ap} y Vmax^{ap} de las muestras calentadas a 180°C aparecen en la tabla 91.

Tabla 91. Comparación de los parámetros cinéticos de los sustratos calentados.

Sustrato	t(h)	Km ^{ap} (mM)·10	Vmax ^{ap} (μmol/min mg E)·10 ³	Vmax ^{ap} /Km ^{ap} (μmol min ⁻¹ mg E ⁻¹ / mM)·10
Triolefina	0	1,2 ± 0,2	49,6 ± 2,1	4,2
	1	2,3 ± 0,3	79,1 ± 3,0	3,4
	2	2,3 ± 0,4	93,5 ± 5,3	4,1
1,3 diolefina	0	1,2 ± 0,2	50,1 ± 2,4	4,2
	1	4,3 ± 0,5	131 ± 7,0	3,1
TGOP	0	3,2 ± 0,4	116 ± 4,8	3,6
	1	1,8 ± 0,1	108 ± 2,5	6,0
	2	1,4 ± 0,2	89,9 ± 2,9	6,4
	4	3,4 ± 0,6	93,8 ± 6,0	2,8

De los resultados que aparecen en esta tabla se podría deducir lo siguiente:

i) El calentamiento de los sustratos puros, triolefina y 1,3 diolefina, provocó un aumento de la Vmax^{ap} de la enzima, hecho que no se apreció cuando se calentaron los TGOP, de origen vegetal, que en este caso mostraron una Vmax^{ap} prácticamente constante. Una interpretación de este hecho sería la que se expone a continuación.

Cuando se compara la composición de las muestras de trioleína y TGOP después de su calentamiento (tablas 51 y 52) se puede observar que:

a) el contenido en triglicéridos sin alterar, sustratos naturales de la lipasa pancreática, disminuyó en un 77,7 y un 60,5% entre la muestra basal y la más alterada para la trioleína (calentada 1 h) y los TGOP (calentados 4 horas) respectivamente.

b) La cantidad de compuestos poliméricos, presentes en las muestras con mayor grado de alteración, fue similar en ambos casos, presentando valores de 15,9 *versus* 16,6 mg/100 mg de muestra para la trioleína calentada 2 horas y los TGOP calentados 4 horas respectivamente.

Por tanto, según estos resultados no se entiende el diferente comportamiento de ambos tipos de sustratos. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 91 las muestras de TGOP sin alterar presentaron un valor mayor de V_{max}^{ap} (116 *versus* 49,6 y 50,1 para los TGOP, trioleína y 1,3 dioleína respectivamente). Esta diferencia en los valores de V_{max}^{ap} , como se ha comentado en el apartado IV.3.3.1, correspondiente a muestras sin alterar, se podría deber a la mayor capacidad de emulsificación de dichos sustratos que vendría dada por su diferente composición en ácidos grasos (apartado IV.3.1.2.1) y la presencia de componentes minoritarios (Cottrell, 1991; Goh, 1985).

Como se ha dicho anteriormente (apartado IV.3.2.1.2), el aumento encontrado en las velocidades máximas de reacción de hidrólisis de la trioleína y 1,3 dioleína después de calentarse se debería a una mejora en la capacidad de emulsificación de dichas sustratos.

La diferencia entre lo observado en el caso de sustancias puras como trioleína y 1,3 dioleína y los TGOP (origen vegetal), podría deberse a que la mejora de la capacidad de emulsificación sería mucho mayor en las primeras debido a que los TGOP presentarían una mayor facilidad a emulsionarse de partida. Por ello, como puede observarse en la tabla 91 los valores de V_{max}^{ap} de trioleína y dioleína alteradas son del mismo orden que los observados con TGOP.

ii) El calentamiento de los sustratos puros (trioleína y 1,3 dioleína) ocasionó un aumento de la K_m^{ap} de la enzima, hecho que no se apreció con las muestras de TGOP, que se puede decir que mostraron una K_m^{ap} mas bien constante, sin mostrar una tendencia clara a disminuir o aumentar.

iii) En cuanto a las constantes de especificidad (V_{max}^{ap}/K_m^{ap}), es de resaltar que son todas practicamente del mismo orden (en torno a $0,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg E}^{-1}/\text{mM}$),

independientemente del sustrato empleado y del tiempo de calentamiento. La pregunta que surgiría a continuación sería: ¿A qué se debe esta constancia si en algunos casos, por ejemplo con los sustratos puros la V_{max}^{ap} y K_m^{ap} aumentan con el calentamiento?. La interpretación parece sencilla, se debe a que la variación de V_{max}^{ap} y K_m^{ap} es en el mismo sentido (ambas aumentan) y lo hacen proporcionalmente (ambas se duplican o triplican) lo cual origina que ambos efectos se compensen y su cociente se mantenga aproximadamente inalterado. Esta constancia podría tener su importancia, ya que significaría que la especificidad por los sustratos no se vería alterada por el calentamiento, de forma que si todas estas formas se encontraran presentes simultáneamente, todas ellas se hidrolizarían a velocidades semejantes. Esta hipótesis podría tener algún significado físico, en el sentido que la lipasa pancreática porcina, y posiblemente las lipasas en general, son poco específicas por naturaleza, de forma que, con tal de que el sustrato tenga enlaces ester del glicerol, la enzima los reconoce con semejante facilidad, al margen un poco de los numerosos factores que intervienen en la lipólisis: tipo de emulsión, tamaño de gotícula, ..etc. Obviamente hablando en términos generales y a la luz de lo observado en la tabla 91.

iv) En el caso de los aceites utilizados en la fritura de patatas, olefina de palma (tabla 76) y aceite de girasol (tabla 87), se puede apreciar como el número de fritura no afecta a V_{max}^{ap} ni a K_m^{ap} .

IV.4 LIPASA PANCREATICA IN VITRO. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA LIPOLISIS.

A fin de estudiar la acción hidrolítica de la lipasa pancreática porcina sobre aceites vegetales con distinto grado de alteración, se procedió a la caracterización de los diferentes sustratos empleados antes y después de la hidrólisis. La caracterización de los mismos se realizó mediante la técnica de HPSEC, ya señalada en el apartado (III.4.2).

La hidrólisis de trioleína, oleína de palma sin usar y usada en 40 y 90 frituras de patatas, así como las fracciones no alteradas y alteradas de dichas oleínas de palma, se llevó a cabo según una modificación de la Norma UNE 55-079-73 (1973), como se indica en el apartado III.4.2 de Materiales y Métodos.

Los diferentes ensayos se realizaron a un tiempo de hidrólisis de 20 minutos. Este tiempo se escogió en función de los resultados obtenidos por Márquez Ruiz (1990), quién encontró, en similares condiciones experimentales a las del presente estudio, que la hidrólisis de los sustratos alterados apenas variaba a partir de los 15 primeros minutos de reacción. Dichos resultados fueron corroborados por nosotros en ensayos preliminares realizados a 20 , 30 y 40 minutos de hidrólisis respectivamente.

IV.4.1 HIDROLISIS ENZIMATICA DE SUSTRATOS NO ALTERADOS.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina durante 20 minutos de la trioleína, y de la fracción de triglicéridos no alterados procedentes de la oleína de palma sin usar (TG 0) y usada 40 (TG 40) y 90 veces (TG 90) respectivamente para freír patatas.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 92. En dicha tabla se puede observar que respecto a la trioleína, sólo el $5,3 \pm 1,2$ % de los triglicéridos permanecieron sin hidrolizar. La cantidad de ácidos grasos libres formados después de la hidrólisis fue de $53,1 \pm 1,8$ mg/100 mg de muestra, cantidad próxima al valor máximo teórico de 66% de ácidos grasos que podrían liberarse debido a la especificidad 1,3 de la lipasa pancreática porcina (Brockerhoff, 1968 y 1970).

Tabla 92. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de la trioleína y los triglicéridos no polares de oleína de palma sin usar (TG 0) y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas (TG 40 y TG 90, respectivamente).

Muestra	T	Composición (mg/100 mg de muestra)			
		TG	DG	MG	AGL
Trioleína	0	100	--	--	--
	20	5,3±1,2 ^a	8,8±5,0 ^a	32,8±2,1 ^a	53,1±1,8 ^a
TG 0	0	100	--	--	--
	20	25,1±1,4 ^b	25,4±2,3 ^b	19,0±0,8 ^b	30,5±1,2 ^b
TG 40	0	100	--	--	--
	20	21,5±3,7 ^{a,b}	25,5±1,2 ^b	20,3±1,5 ^b	32,7±1,5 ^b
TG 90	0	100	--	--	--
	20	22,9±4,7 ^{a,b}	23,9±2,8 ^b	21,1±1,1 ^b	32,0±1,3 ^b

T: tiempo de hidrólisis (minutos); TG: triglicéridos; DG: diglicéridos; MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Letras diferentes dentro de la misma columna significan diferencias significativas (al menos $p < 0,01$; ANOVA de una vía).

Respecto al ataque hidrolítico de la fracción de TG 0, TG 40 y TG 90, se puede observar que el grado de hidrólisis encontrado en las diferentes muestras después de 20 minutos fue similar. Dicha afirmación se apoya en la cantidad de ácidos grasos liberados después de la hidrólisis que fue de 30,5±1,2 , 32,7±1,5 y 32,0±1,3 mg/100 mg de muestra para la fracción de TG 0, TG 40 y TG 90, respectivamente.

En general, las diferentes muestras de triglicéridos no polares estudiadas, presentaron una composición similar después de ser hidrolizadas por la lipasa pancreática porcina durante 20 minutos (tabla 92).

Cuando se compara el ataque de la lipasa pancreática porcina sobre los triglicéridos no alterados de las diferentes muestras de oleína de palma con el producido sobre la trioleína (tabla 92), se puede observar que la hidrólisis enzimática en estas condiciones experimentales fue diferente y más eficaz en el caso de esta última.

Este hecho es más evidente cuando se cuantificaron conjuntamente los monoglicéridos y ácidos grasos libres como productos de la hidrólisis enzimática y por otro lado los triglicéridos y diglicéridos que serían productos intermedios o que no han sido hidrolizados (tabla 93). De esta forma, en la trioleína, la fracción de monoglicéridos más ácidos grasos liberados como consecuencia de la lipólisis, supuso el $86,0 \pm 3,9$ % de la muestra original, mientras que para los triglicéridos inalterados de las diferentes oleínas de palma esta fracción constituyó entre el $49,5 \pm 1,8$ y $53,2 \pm 2,9$ de la muestra de partida.

Estos resultados tan diferentes, creemos que deberían ser atribuidos a la diferente composición de los triglicéridos de las muestras estudiadas.

Así, respecto a su contenido en ácidos grasos, como se puede observar en la tabla 44, la fracción de triglicéridos no alterados de la oleína de palma presenta cantidades importantes de ácidos grasos saturados tales como el ácido palmítico ($\approx 40\%$) y en menor proporción el ácido esteárico ($\approx 4\%$), mientras que la trioleína únicamente está compuesta por ácido oleico (insaturado). Como es bien sabido, los ácidos grasos saturados poseen un mayor punto de fusión que los insaturados, lo que podría provocar que, en las condiciones experimentales utilizadas, las muestras de triglicéridos no polares de la oleína de palma podrían presentar una menor dispersión en medio acuoso que la trioleína y por tanto ser hidrolizados peor por la lipasa pancreática (Brockerhoff y Jensen, 1974).

Tabla 93. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de la **trioleína** y los **triglicéridos no polares de oleína de palma** sin usar (TG 0) y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas (TG 40 y TG 90, respectivamente). Agrupación de las diferentes fracciones.

Muestra	T	Composición (mg/100 mg de muestra)	
		TG + DG	MG + AGL
Trioleína	0	100	--
	20	14,1 ± 3,9 ^a	86,0 ± 3,9 ^a
TG 0	0	100	--
	20	50,5 ± 1,8 ^b	49,5 ± 1,8 ^b
TG 40	0	100	--
	20	47,0 ± 3,0 ^b	53,0 ± 3,0 ^b
TG 90	0	100	--
	20	46,8 ± 2,3 ^b	53,2 ± 2,9 ^b

Para identificación de abreviaturas ver tabla 93. Los valores representan la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Letras diferentes dentro de la misma columna significan diferencias significativas (al menos $p < 0,01$; ANOVA de una vía).

Se debe destacar que, mientras que en el presente estudio la hidrólisis de la trioleína fue más eficaz que la de los triglicéridos no polares de la oleína de palma, dicha fracción de triglicéridos presentó a su vez unos valores superiores de K_m^{ap} y V_{max}^{ap} que la trioleína ($3,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-1}$ versus $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-1}$ mM y $116 \pm 4,8 \cdot 10^{-1}$ versus $49,6 \pm 2,1 \cdot 10^{-1}$ μ mol/min mg E (tabla 90). Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse en base a los siguientes aspectos:

i) la relación enzima/sustrato empleada en ambos métodos fue diferente (ver Materiales y Métodos, apartados III.3.1.4.1 y III.4.2).

ii) las condiciones de emulsificación no fueron las mismas. Así, mientras que en el método del pH-stato la emulsificación se realizó por ultrasonidos utilizando goma arábica

como agente emulgente, cuando se aplicó la modificación de la Norma UNE 55-079-73 (1973) las muestras se sometieron a agitación magnética durante 10 minutos en presencia de colato sódico como agente emulgente. Este diferente tratamiento probablemente conduce a un grado de emulsificación diferente y, por tanto, a resultados distintos.

iii) La hidrólisis realizada según la modificación de la Norma UNE 55-079-73 (1973), se llevó a cabo en presencia de iones calcio mientras que este catión no se encontraba presente cuando se midió la actividad enzimática en el pH-stato.

A este respecto, es conocido que durante la digestión de las grasas *in vivo*, los ácidos grasos libres saturados de cadena larga como el palmítico y el esteárico tienden a formar complejos insolubles con el calcio que no son absorbidos (Benson, 1981; Guthrie y col., 1977). Dichos complejos podrían también formarse en nuestras condiciones experimentales *in vitro*.

iv) otra diferencia entre ambos medios es que mientras que uno mide la actividad enzimática a pH fijo ya que la acidez producida se va neutralizando con la NaOH valorante, cuando las hidrólisis se realizaron según Norma UNE 55-079-73 (1973), el pH del medio tiende a mantenerse constante en virtud del tampón Tris utilizado, a pesar de la cantidad de ácidos grasos liberados durante la hidrólisis.

IV.4.2 HIDROLISIS ENZIMATICA DE OLEINA DE PALMA UTILIZADA EN FRITURAS SUCEсивAS DE PATATAS.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de oleína de palma sin usar y empleada en 40 y 90 frituras de patatas, determinándose la composición de los diferentes sustratos empleados antes y después de su hidrólisis. Los distintos componentes analizados fueron polímeros y dímeros de triglicéridos, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

Siguiendo las directrices de Márquez-Ruiz y col. (1992a), para facilitar el estudio de los resultados, se agruparon los diferentes componentes de las muestras en bloques correspondientes a:

i) componentes oligoméricos (polímeros + dímeros de triglicéridos), es decir, compuestos cuya hidrólisis es más dificultosa.

- ii) triglicéridos + diglicéridos, que son compuestos formados a partir de los triglicéridos y de los oligómeros o que no han sido hidrolizados.
- iii) monoglicéridos + ácidos grasos libres, como productos de la hidrólisis.

En conjunto, los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de dos vías teniendo en cuenta el número de frituras realizadas (efecto fritura) y la composición de las muestras antes y después del ataque lipolítico (efecto hidrólisis), encontrándose una interacción significativa de estos dos efectos para los diferentes componentes de la muestra, excepto en el caso de los diglicéridos, como se puede observar en la tabla 94. Estos mismos resultados se obtuvieron después del agrupamiento de las diferentes fracciones que se realizó de la forma indicada anteriormente.

Tabla 94. Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas.

Grupo de compuestos	Efecto Fritura	Efecto Hidrólisis	Interacción fritura x hidrólisis
Polímeros de triglicéridos	$p < < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Dímeros de triglicéridos	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
Triglicéridos (TG)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
Diglicéridos (DG)	NS	$p < 0,001$	NS
Monoglicéridos (MG)	$p < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < 0,001$
Acidos grasos libres (AGL)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
Polímeros + Dímeros de TG	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
TG + DG	$p < 0,01$	$p < < 0,001$	$p < 0,001$
MG + AGL	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$

Debido a la existencia de interacciones significativas entre los efectos estudiados (efecto fritura y efecto hidrólisis), éstos debieron ser analizados independientemente en los diferentes componentes de las muestras, así como en sus agrupaciones (tablas 95 y 96).

Tabla 95. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas.

Composición (mg/100 mg de muestra).							
Muestra	T	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG	DG	MG	AGL
Oleína de palma 0	0	0,00 ± 0,00 ^a	1,04 ± 0,02 ^a	92,43 ± 0,10 ^a	6,20 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
	20	0,00 ± 0,00 ^a	0,23 ± 0,04 ^a	15,01 ± 2,40 ^a	24,95 ± 0,20 ^a	24,82 ± 1,10 ^a	34,99 ± 1,50 ^a
Oleína de palma 40	0	0,70 ± 0,02 ^b	3,75 ± 0,06 ^b	89,10 ± 0,20 ^a	6,19 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a
	20	0,30 ± 0,02 ^b	1,58 ± 0,10 ^b	11,48 ± 2,10 ^a	24,33 ± 1,60 ^a	25,37 ± 1,70 ^a	36,95 ± 1,50 ^a
Oleína de palma 90	0	4,12 ± 0,02 ^c	8,87 ± 0,09 ^c	80,46 ± 1,20 ^b	6,38 ± 0,15 ^a	0,05 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,01 ^a
	20	2,65 ± 0,10 ^c	6,29 ± 0,02 ^c	27,46 ± 0,6 ^b	26,49 ± 0,30 ^a	13,41 ± 0,10 ^b	23,70 ± 0,30 ^b

Para identificación de abreviaturas ver tabla 92. ^a significativo respecto a sus basales a tiempo 0 (al menos p < 0,001). Valores dentro de la misma columna con diferentes letras para el mismo tiempo de hidrólisis, son diferentes significativamente (al menos p < 0,01); test pareado).

En la tabla 96 aparece la cuantificación de los sustratos antes y después de la hidrólisis teniendo en cuenta la agrupación de los diferentes componentes.

Tabla 96. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas. Agrupación de las diferentes fracciones.

Muestra	T	Composición (mg/100 mg de muestra).		
		Polímeros + Dímeros de TG	TG + DG	MG + AGL
Oleína de palma 0	0	$1,14 \pm 0,02^a$	$98,63 \pm 0,1^a$	$0,24 \pm 0,01^a$
	20	$0,23 \pm 0,04^{*a}$	$39,96 \pm 2,6^{*a}$	$59,82 \pm 2,6^{*a}$
Oleína de palma 40	0	$4,45 \pm 0,03^b$	$95,29 \pm 0,1^a$	$0,28 \pm 0,01^a$
	20	$1,88 \pm 0,10^{*b}$	$35,81 \pm 3,0^{*a}$	$62,32 \pm 3,2^{*a}$
Oleína de palma 90	0	$12,99 \pm 0,1^c$	$86,84 \pm 1,2^b$	$0,18 \pm 0,01^a$
	20	$8,94 \pm 0,08^{*c}$	$53,95 \pm 0,3^{*b}$	$37,12 \pm 0,4^{*a}$

Para identificación de abreviaturas ver tabla 92. * significativo respecto a sus originales (al menos $p < 0,001$). Valores dentro de la misma columna con diferentes letras para el mismo tiempo de hidrólisis, son diferentes significativamente (al menos $p < 0,01$; test pareado).

En las tablas 95 96 se puede observar que, en todos los casos, las muestras hidrolizadas fueron significativamente diferentes a las muestras de partida. El grado de hidrólisis de la oleína de palma sin usar fue similar al de dicha oleína procedente de 40

frituras de patatas, como se deduce de la cantidad conjunta semejante de monoglicéridos y de ácidos grasos liberados después de 20 minutos de reacción enzimática $59,82 \pm 2,6$ versus $62,32 \pm 3,2$ mg/100 mg de muestra para la oleína de palma sin usar y la empleada en 40 frituras de patatas respectivamente (tabla 96). Sin embargo, la cantidad de productos liberados después de la hidrólisis de la oleína de palma después de 90 frituras de patatas fue significativamente menor ($37,12 \pm 0,4$ mg/100 mg de muestra) (tabla 96).

Los resultados obtenidos podrían explicarse en principio atendiendo al contenido en triglicéridos no alterados de las muestras, sustratos naturales de la enzima lipasa pancreática. Así, mientras que el contenido de triglicéridos no alterados antes de la hidrólisis fue similar en la oleína de palma sin usar y utilizada en 40 frituras de patatas ($92,4 \pm 0,1$ versus $89,1 \pm 0,2$ mg/100 mg de muestra). Dicho contenido en triglicéridos no alterados fue mucho menor en la oleína de palma usada 90 veces para freir patatas ($80,5 \pm 1,2$ mg/100 mg de muestra).

En cuanto a la fracción de oligómeros (polímeros + dímeros de triglicéridos), que se incrementó significativamente respecto a las muestras originales al aumentar el número de frituras, podemos afirmar que fue hidrolizada por acción de la lipasa pancreática porcina. Sin embargo, el grado de hidrólisis de dichos compuestos fue menor a medida que aumentó su proporción en la muestra, desapareciendo como consecuencia de la hidrólisis después de 20 minutos el 79,8%, 57,8% y 31,2% de los oligómeros en la oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras respectivamente (tabla 96).

En resumen, estos resultados indicarían, respecto al ataque lipolítico de la oleína de palma utilizada en diferentes frituras de patatas, que cuanto mayor es la alteración de los sustratos menor es la hidrólisis enzimática llevada a cabo por la lipasa pancreática porcina, y por tanto, la cantidad de productos liberados como consecuencia de la lipólisis es significativamente menor.

Estos resultados serían análogos a los obtenidos por diversos autores como Yoshida y Alexander (1983), los cuales defienden que el grado de hidrólisis enzimática de las diferentes fracciones de acilglicéridos, que constituyen una muestra de grasa, se produce de distinta forma dependiendo de la alteración termooxidativa y de la cantidad de compuestos

polares en dicha muestra. Estos autores calentaron diferentes aceites vegetales y posteriormente los fraccionaron mediante cromatografía en columna en compuestos monoméricos, diméricos y oligoméricos. Mediante la hidrólisis posterior de dichas fracciones con lipasa pancreática comprobaron que cuanto mayor era el grado de polimerización de los sustratos menor la hidrólisis realizada por la lipasa pancreática porcina.

Márquez-Ruiz y col. (1992a), realizando ataques lipolíticos con lipasa pancreática porcina según Norma UNE (1973), demostraron que la hidrólisis de aceite de oliva crudo y calentado a 180°C dependía del peso molecular de los glicéridos, siendo menor a medida que el peso molecular de los compuestos alterados existentes en la grasa aumentaba.

IV.4.3 HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA FRACCION POLAR DE LA OLEINA DE PALMA UTILIZADA EN DIFERENTES FRITURAS DE PATATAS.

La hidrólisis de las fracciones polares de la oleína de palma sin usar y utilizada en frituras sucesivas de patatas se analizó de la misma forma que en el caso de la muestra de oleína completa comentada con anterioridad en el apartado IV.4.2.

Como en dicho apartado, se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de dos vías que cuantificó el efecto fritura y el efecto hidrólisis. En este caso, a diferencia de lo ocurrido en la hidrólisis de la oleína de palma completa (tabla 94), no hubo interacción entre los efectos fritura e hidrólisis para los polímeros y dímeros de triglicéridos, ni por tanto para los oligómeros conjuntamente (tabla 97). Sin embargo, al existir una interacción entre dichos efectos para la mayoría de los componentes de las muestras, se procedió a estudiarlos por separado.

Tabla 97. Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de las fracciones polares de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas.

Grupo de compuestos	Efecto fritura	Efecto hidrólisis	Interacción fritura x hidrólisis
Polímeros de triglicéridos	$p < 0,001$	NS	NS
Dímeros de triglicéridos	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	NS
Triglicéridos (TG)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < 0,001$
Diglicéridos (DG)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
Monoglicéridos (MG)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
Acidos grasos libres (AGL)	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < 0,001$
Polímeros + Dímeros de TG	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	NS
TG + DG	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$
MG + AGL	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$	$p < < 0,001$

En la tabla 98 aparecen los resultados obtenidos de la cuantificación de los diferentes compuestos presentes en los sustratos antes y después de su hidrólisis enzimática. En este caso, también se llevó a cabo la agrupación de los diferentes componentes de las muestras, con objeto de simplificar los resultados, en oligómeros (polímeros + dímeros de triglicéridos), compuestos de peso molecular intermedio (triglicéridos + diglicéridos) y productos finales de la hidrólisis enzimática (monoglicéridos + ácidos grasos libres). Los resultados de dicha agrupación aparecen en la tabla 99.

Los sustratos empleados, al estar constituidos únicamente por las fracciones polares de la oleína de palma usada en diferentes frituras, son muestras que presentan un 100% de alteración y concentraciones crecientes de productos termooxidados (tablas 98 y 99).

De esta forma, se observó una gran similitud entre la hidrólisis de la fracción polar de la oleína de palma sin usar y utilizada 40 veces para freir patatas, como se deduce de la

cantidad de ácidos grasos formados (en ambos casos de ≈ 22 mg/100 mg de muestra), mientras que la formación de dichos compuestos después de la hidrólisis de la fracción polar de oleína de palma usada 90 veces fue significativamente menor (≈ 13 mg/100 mg de muestra).

Tabla 98. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de las fracciones polares de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas.

Composición (mg/100 mg de muestra).							
Muestra	T	Polímeros de TG	Dímeros de TG	TG	DG	MG	AGL
Polares 0	0	0,00 \pm	12,03 \pm	12,08 \pm	72,66 \pm	0,47 \pm	2,75 \pm
		0,00 ^a	0,8 ^a	1,9 ^a	1,4 ^a	0,05 ^a	1,09 ^a
	20	0,00 \pm	6,23 \pm	4,47 \pm	38,50 \pm	25,47 \pm	25,34 \pm
		0,00 ^a	0,70 ^{*a}	0,40 ^{*a}	1,8 ^{*a}	1,4 ^{*a}	1,4 ^{*a}
Polares 40	0	5,92 \pm	24,45 \pm	25,85 \pm	42,97 \pm	0,23 \pm	1,13 \pm
		0,50 ^b	1,0 ^b	0,4 ^b	1,8 ^b	0,03 ^a	0,03 ^a
	20	4,67 \pm	18,17 \pm	8,08 \pm	26,24 \pm	19,54 \pm	23,30 \pm
		0,20 ^{*b}	0,5 ^{*b}	0,70 ^{*b}	0,7 ^{*b}	0,7 ^{*b}	0,9 ^{*a}
Polares 90	0	13,94 \pm	30,05 \pm	31,58 \pm	23,46 \pm	0,16 \pm	0,81 \pm
		0,0 ^c	0,1 ^c	0,0 ^c	0,1 ^c	0,04 ^a	0,02 ^a
	20	13,93 \pm	25,24 \pm	12,56 \pm	21,24 \pm	12,41 \pm	14,62 \pm
		0,1 ^c	0,9 ^{*c}	1,9 ^{*c}	0,9 ^c	1,7 ^{*c}	1,9 ^{*b}

Para identificación de abreviaturas ver tabla 92. * significativo respecto a sus originales (al menos $p < 0,001$). Valores dentro de la misma columna con diferentes letras para el mismo tiempo de hidrólisis son diferentes significativamente (al menos $p < 0,05$); test pareado).

Tabla 99. Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina de las fracciones polares de oleína de palma sin usar y después de 40 y 90 frituras repetidas de patatas. **Agrupación de las diferentes fracciones.**

Muestra	T	Composición (mg/100 mg de muestra).		
		Polímeros + Dímeros de TG	TG + DG	MG + AGL
Polares	0	12,03±0,8 ^a	84,75±0,5 ^a	3,22±1,10 ^a
0	20	6,23±0,70 ^{*a}	42,97±2,1 ^{*a}	50,80±2,8 ^{*a}
Polares	0	30,37±1,5 ^b	68,29±1,5 ^b	1,35±0,05 ^a
40	20	22,83±0,7 ^{*b}	34,32±1,2 ^{*b}	42,85±1,4 ^{*b}
Polares	0	43,99±0,1 ^c	55,04±1,0 ^c	0,97±0,02 ^a
90	20	39,84±0,5 ^{*c}	35,54±1,6 ^{*c}	24,62±2,1 ^{*c}

* significativo respecto a sus originales (al menos $p < 0,001$). Valores dentro de la misma columna con diferentes letras para el mismo tiempo de hidrólisis, son diferentes significativamente (al menos $p < 0,05$); ANOVA de 2 vías.

Sin embargo, cuando se agruparon los diferentes componentes de las muestras (tabla 99), la fracción de productos finales de la hidrólisis (monoglicéridos + ácidos grasos libres) presentó diferencias significativas entre las muestras en crudo y procedentes de distintas frituras, hecho que estuvo marcado principalmente por la diferente aparición de monoglicéridos.

Asimismo, se comprobó de nuevo que la degradación de los oligómeros presentes en las muestras fue menor al aumentar su proporción dentro de las mismas (47,68% para la fracción polar de oleína de palma sin usar, y 24,58% y 10,97% para las fracciones polares de oleína de palma utilizadas durante 40 y 90 frituras de patatas, respectivamente)(tabla 408). Estos datos son similares a los descritos por Márquez Ruiz y col. (1992a) y Yoshida y Alexander (1983) en fracciones polares procedentes de otros aceites.

Merece la pena destacar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre los polímeros de las diferentes muestras estudiadas, ya que, mientras que en la fracción polar de la oleína de

palma utilizada 40 veces con un contenido de polímeros de $5,92 \pm 0,5$ mg/100 mg de muestra, desapareció una pequeña cantidad de los mismos (21,11%) (tabla 98). Sin embargo, cuando se realizó el ataque lipolítico sobre la fracción polar de la oleína procedente de 90 frituras, dicha reacción no se produjo sobre los polímeros de la muestra, ya que su contenido no varió después de la hidrólisis ($13,93 \pm 0,1$ respecto a $13,94 \pm 0,0$ mg/100 mg de la muestra inicial (tabla 98).

En resumen, las variaciones producidas en los tres tipos de sustratos de su contenido en los diferentes compuestos estudiados fueron las siguientes:

* Respecto al **número de frituras**:

i) **Triglicéridos no alterados de la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras** (tabla 92). Los triglicéridos son los únicos componentes de dichas muestras independientemente del número de frituras realizadas con la oleína de la que proceden.

ii) **Oleína de palma con diferente grado de alteración** (tabla 95). Los triglicéridos son los componentes mayoritarios y su contenido disminuye en los sustratos con el número de frituras. Los polímeros y dímeros de triglicéridos son componentes minoritarios de las muestras y aumenta su proporción con el número de frituras. Por último, los diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres son componentes minoritarios también pero su contenido no varía a pesar de las sucesivas frituras.

iii) **Fracción polar de la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras** (tabla 98). En este caso, los diglicéridos se presentan como el componente mayoritario cuando se trata de la fracción polar de la oleína de palma sin usar. Sin embargo, a medida que aumenta el número de frituras en las que son empleadas las oleínas de las que proceden, las muestras poseen menor cantidad de diglicéridos y aumenta su contenido de forma paralela en triglicéridos (oxidados al menos en uno de sus restos acilo) y dímeros de triglicéridos. El contenido de los polímeros de triglicéridos aumenta en las muestras a medida que éstos últimos provienen de oleínas usadas en mayor número de frituras. En cuanto a los monoglicéridos y ácidos grasos libres, su contenido puede considerarse constante en las diferentes muestras.

* Respecto a la hidrólisis enzimática.

i) **Triglicéridos no alterados de la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras** (tabla 92). La lipólisis produce una desaparición de triglicéridos y una aparición de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres en todos los sustratos.

ii) **Oleína de palma con diferente grado de alteración** (tabla 95). Después de ser hidrolizados, dichos sustratos poseen un menor contenido en triglicéridos y, en polímeros y dímeros de triglicéridos. Por el contrario, aumenta su contenido en diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

iii) **Fracción polar de la oleína de palma utilizada en sucesivas frituras** (tabla 98). Después de la hidrólisis enzimática, los sustratos presentan un menor contenido en triglicéridos y en dímeros de triglicéridos. Por su parte, la cantidad de diglicéridos y polímeros de triglicéridos disminuye después de la hidrólisis, excepto cuando el sustrato fue la fracción polar de la oleína de palma utilizada en 90 frituras de patatas, donde la cantidad de dichos compuestos no se modificó después de 20 minutos de ataque lipolítico. Después de la hidrólisis, como es lógico, aumentó la cantidad de monoglicéridos y ácidos grasos libres en las muestras.

IV.4.4 ANALISIS FACTORIAL EN COMPONENTES PRINCIPALES.

Al objeto de caracterizar los factores que explicarían en mayor proporción la variación de la composición de los diferentes compuestos constituyentes de la muestras estudiadas, se realizó un test estadístico de análisis factorial en componentes principales. Dicho análisis se aplicó de forma independiente en los tres tipos de sustratos utilizados:

i) sustratos no alterados constituidos únicamente por triglicéridos (trioleína y triglicéridos no polares de la oleína de palma sin usar y utilizada en diferentes frituras de patatas).

ii) sustratos con diferente grado de alteración (oleína de palma sin usar y empleada en frituras sucesivas de patatas).

iii) sustratos alterados en su totalidad, constituídos sólo por la fracción polar de oleína de palma sin usar y usada en sucesivas frituras de patatas.

IV.4.4.1 Sustratos no alterados.

Cuando se aplica el análisis factorial para estudiar la variación de los diferentes compuestos de las muestras antes y después de la hidrólisis enzimática, aparece un único factor que explica la totalidad de las variaciones existentes en las muestras. Según ésto las variaciones experimentadas por los diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres presentan una correlación muy elevada e inversa con la variación de los triglicéridos (tabla 100).

Tabla 100. Análisis factorial en componentes principales de las variaciones en la composición de los **sustratos no alterados** debidas a la hidrólisis enzimática.

	Factor 1
Triglicéridos	-1,000
Monoglicéridos	0,975
Acidos grasos libres	0,973
Diglicéridos	0,838
Valor propio	3,599

Matriz de pesos estadísticos del factor reorganizada (en las columnas aparecen en orden decreciente de la varianza explicada por los factores).

Estos resultados parecen totalmente lógicos y predecibles ya que, en estos sustratos, se parte de fracciones constituidas únicamente por triglicéridos no alterados que, como consecuencia de la hidrólisis enzimática, originan productos tales como diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

IV.4.4.2 Oleína de palma con diferente grado de alteración.

El análisis factorial de los resultados obtenidos de composición de la oleína de palma con diferente grado de alteración antes y después de su hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina, proporcionó la existencia de dos factores principales cuyo valor de varianza explicada fue de 4,2502 y 1,6585 respectivamente, y que en conjunto explican prácticamente el 100% de la variación de las muestras.

Merece ser destacado que en el análisis factorial, el factor 1 explica con mayor porcentaje la variabilidad de los resultados que los factores 2, 3, etc.

Tabla 101. Análisis factorial en componentes principales de las variaciones en la composición de oleína de palma con diferente grado de alteración debidas a la hidrólisis enzimática.

	Factor 1	Factor 2
Triglicéridos	-0,996	0,000
Diglicéridos	0,974	0,000
Acidos grasos libres	0,970	0,000
Monoglicéridos	0,945	-0,292
Polímeros de triglicéridos	0,000	0,991
Dímeros de triglicéridos	0,000	0,972
Valores propios	3,831	2,078

Matriz de pesos estadísticos del factor reorganizada (en las columnas aparecen en orden decreciente de la varianza explicada por los factores). Las filas han sido reordenadas de tal forma que para factores sucesivos, los pesos > de 0,500 aparecen primero y los pesos menores de 0,250 han sido reemplazados por cero.

En la tabla 101 figuran los coeficientes de correlación existentes entre cada una de las variables en relación a los factores encontrados. De su estudio se puede deducir que:

i) respecto al primer factor, existe una correlación inversa elevada entre la variación del contenido de triglicéridos y la de otros compuestos como diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (tabla 101).

ii) esta relación sería modulada por la presencia de polímeros y dímeros de triglicéridos en las muestras, cuya variación está altamente correlacionada según el segundo factor (tabla 101).

IV.4.4.3 Fracción polar de la oleína de palma con diferente grado de alteración.

El análisis factorial de la composición de la fracción polar de oleína de palma sin usar y empleada en sucesivas frituras de patatas antes y después de su hidrólisis enzimática con lipasa pancreática porcina, nos proporcionó la existencia, como en el caso anterior, de dos factores principales con valores de la varianza explicada de 4,2502 y 1,6585 respectivamente, que en conjunto explican prácticamente la totalidad ($\approx 100\%$) de la variaciones encontradas en las muestras.

En la tabla 102 aparecen los coeficientes de correlación existentes entre cada una de las variables en relación a los factores encontrados. De su estudio se puede deducir:

i) en relación al primer factor, la variación del contenido de ácidos grasos libres y monoglicéridos, está altamente correlacionada pero en sentido inverso con la variación en el contenido de dímeros de triglicéridos y de monómeros de triglicéridos (estos últimos en la fracción polar están constituidos únicamente por triglicéridos oxidados).

ii) además, existe un segundo factor mediante el cual estarían altamente correlacionados, pero en sentido inverso, la variación del contenido en polímeros y dímeros de triglicéridos por un lado, y por otro la de los diglicéridos. Estas relaciones modularían en conjunto la variación de monoglicéridos y ácidos grasos libres, así como de dímeros de triglicéridos y de monómeros de triglicéridos que están relacionadas mediante el primer factor.

Por último, cuando se comparan los resultados obtenidos mediante el análisis factorial de la variación de los componentes de la muestra antes y después de la hidrólisis de oleína de palma con diferente grado de alteración, así como de sus fracciones respectivas de triglicéridos no alterados y compuestos polares, se observan diferencias. Dichas diferencias vendrían marcadas por la distinta composición de los tres tipos de sustratos (oleína y fracciones de triglicéridos no modificados y compuestos polares) en triglicéridos, diglicéridos y dímeros de triglicéridos fundamentalmente (tablas 92, 95, y 98).

Tabla 102. Análisis factorial en componentes principales de las variaciones en la composición de la fracción polar de la oleína de palma con diferente grado de alteración debidas a la hidrólisis enzimática.

	Factor 1	Factor 2
Acidos grasos libres	0,998	0,000
Monoglicéridos	0,994	0,000
Triglicéridos	-0,835	0,455
Diglicéridos	-0,349	-0,928
Polímeros de triglicéridos	0,283	0,924
Dímeros de triglicéridos	0,560	0,810
Valores propios	3,196	2,579

Matriz de pesos estadísticos del factor reorganizada (en las columnas aparecen en orden decreciente de la varianza explicada por los factores). Las filas han sido reordenadas de tal forma que para factores sucesivos, los pesos > de 0,500 aparecen primero y los pesos menores de 0,250 han sido reemplazados por cero.

En resumen, teniendo en cuenta todas estas observaciones, de los resultados del análisis factorial en componentes principales podría deducirse lo siguiente:

i) en las muestras de oleína de palma el incremento producido durante la hidrólisis enzimática en la cantidad monoglicéridos y ácidos grasos está muy correlacionado con la disminución en la cantidad de triglicéridos (componentes mayoritarios de la muestra). Sin embargo, cuando se hidrolizaron las fracciones polares de la oleína de palma, el aumento de monoglicéridos y ácidos grasos en las muestras estuvo muy correlacionado además con la disminución de los dímeros de triglicéridos en la muestra, lo que podría deberse a la mayor proporción de dichos compuestos en las muestras de partida, que es similar a la de los triglicéridos.

ii) respecto a los diglicéridos, su incremento en las muestras de oleína de palma después de la hidrólisis sería el resultado del ataque lipolítico, como sucedía en las fracciones de triglicéridos puros. Sin embargo, durante la hidrólisis de la fracción polar de dichas muestras de oleína, los diglicéridos actuarían fundamentalmente como sustrato debido a su gran concentración en las muestras, ya que ésta disminuye marcadamente después de la reacción enzimática. Esta disminución del contenido de diglicéridos durante la hidrólisis no se produjo cuando el sustrato fue la fracción polar de la oleína de palma usada en 90 frituras de patatas. Estos resultados, pueden explicarse porque en esta última muestra los diglicéridos ya no eran los componentes mayoritarios y la cantidad hidrolizada debió ser igual a la que apareció como producto, por lo que no se modificó su contenido después de la hidrólisis.

V.- CONCLUSIONES

De la labor realizada se pueden obtener, entre otras, las siguientes conclusiones:

A.- Sobre el estudio de la alteración producida en diferentes aceites vegetales como consecuencia del proceso de fritura.

A.1.- Mediante cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño molecular (HPSEC), usando un detector de índice de refracción, podemos obtener una respuesta equivalente para los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y fracción polar total, lo cual simplifica enormemente la cuantificación de los productos específicos de la alteración de un aceite.

A.2.- Las frituras sucesivas de patatas producen un incremento de la alteración en el aceite de girasol, que se manifiesta por modificaciones en todos los índices analíticos de carácter general estudiados. Dicha alteración es más intensa cuando las frituras se realizan sin renovación de aceite.

A.3.- Cuando se frien patatas en aceite de girasol sin renovar el aceite, la alteración producida después de 50 frituras, supera el valor límite de 25% de compuestos polares marcado por la legislación vigente para desechar una grasa de fritura. Sin embargo, dicho límite no se alcanza cuando las frituras se realizan renovando frecuentemente el aceite, estabilizándose en un 19%.

A.4.- En ambas modalidades de fritura se produce un predominio de la alteración termooxidativa del aceite de girasol frente a la alteración hidrolítica, siendo éste a su vez más marcado cuando no se produjo renovación de aceite.

A.5.- La adición frecuente de aceite de girasol sin usar al baño de la freidora, mantiene estable la cantidad de triglicéridos dímeros y oxidados en dicha grasa después de 30 frituras de patatas. Por el contrario, cuando las frituras se realizan sin renovación de aceite, estos compuestos siguen aumentando durante la totalidad de las frituras realizadas. El contenido en polímeros de triglicérido es prácticamente el doble en la modalidad de sin renovación.

Conclusiones

A.6.- Las frituras repetidas de patatas en oleína de palma realizadas sin renovación de aceite, incrementan la alteración de dicha grasa de forma lineal. Este hecho se pone de manifiesto por modificaciones significativas en todos los índices de carácter general estudiados.

A.7.- La oleína de palma se muestra como una grasa muy estable, ya que incluso utilizando la modalidad más desfavorable de fritura (sin renovación de aceite), el valor de 25% de compuestos polares marcado por la legislación vigente como límite para desechar una grasa de fritura, no se alcanza hasta después de freír patatas 80 veces. No obstante, debe resaltarse que aproximadamente la cuarta parte de éstos compuestos polares corresponde a diglicéridos.

A.8.- Durante las 90 frituras realizadas se produce únicamente un aumento de los compuestos de alteración termooxidativa, no modificándose los compuestos característicos de la alteración hidrolítica.

A.9.- La elevada correlación encontrada entre los compuestos polares y los ésteres metílicos alterados, permite afirmar que la utilización de ambas técnicas para el seguimiento de la alteración producida en una oleína de palma durante frituras es equivalente.

A.10.- La pérdida de ácido linoleico producida como consecuencia de las frituras se relaciona de forma inversa y muy significativa con el incremento de las fracciones polares de triglicéridos y de ésteres metílicos y con el incremento de la alteración termooxidativa.

B.- Respecto a la caracterización y cuantificación de los diferentes sustratos después de su hidrólisis *in vitro* con lipasa realizada según adaptación de la Norma UNE.

B.1.- la hidrólisis llevada a cabo por la lipasa pancreática sobre sustratos con diferente grado de alteración, aparece modulada principalmente por la concentración y tipo de triglicéridos sin alterar presentes en la muestra. La trioleína se muestra como un sustrato más hidrolizable que los triglicéridos no alterados de la oleína de palma.

B.2.- La lipasa pancreática porcina realiza un ataque hidrolítico mucho menos efectivo sobre sustratos que contienen importantes cantidades de compuestos oligoméricos. Así, sustratos con un 44% de oligómeros de triglicéridos, no son modificados apreciablemente después de 20 minutos de incubación con dicha lipasa.

B.3.- El análisis factorial señala que la disminución de los triglicéridos junto con el aumento de monoglicéridos y ácidos grasos libres producidos en los diferentes sustratos estudiados, explican un porcentaje muy elevado de la variación de la composición de dichos sustratos antes y después de la hidrólisis enzimática. Esta acción está modulada por un segundo factor donde participan polímeros y dímeros de triglicéridos.

C.- Respecto al estudio de la actividad hidrolítica de la lipasa pancreática *in vitro* sobre aceites con diferente grado de alteración.

C.1.- El calentamiento de los sustratos usados como patrón, produce un desplazamiento de la banda de absorción en la región UV-visible de dichos compuestos hacia valores mayores de longitud de onda, así como un aumento en su absorbancia a 270 nm.

C.2.- La hidrólisis de los sustratos estudiados, responde en todos los casos, a un modelo cinético tipo "Michaelis-Menten" debido a que, en dichas muestras, los componentes mayoritarios son triglicéridos o acilglicéridos, los cuales son los sustratos naturales de la lipasa pancreática.

C.3.- Cuando se realiza la hidrólisis enzimática de sustratos sin alterar, la K_m^{ap} es similar tanto para las muestras puras como para los aceites vegetales. Sin embargo, esto no ocurrió en el caso del aceite de oliva emulsionado (Sigma), debido sin duda a que se trata de una emulsión comercial que presenta diferentes características físico-químicas a las del resto de las muestras.

C.4.- Globalmente, todas las muestras sin alterar estudiadas presentan valores muy semejantes en sus constantes de especificidad, lo que se interpreta como que la lipasa

Conclusiones

pancreática porcina, y posiblemente las lipasas en general, constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas con muy poca especificidad respecto a este tipo de sustratos.

C.5.- El calentamiento de sustratos puros trioleína y 1,3 dioleína provoca un aumento de la V_{max}^{ap} de la enzima, lo que no ocurre al calentar los triglicéridos no alterados de la oleína de palma, de origen natural. Esta diferencia se debe a una mejora de la capacidad de emulsificación de los primeros como consecuencia del calentamiento, mientras que éstos últimos presentan una mayor facilidad a emulsionarse de partida.

C.6.- La hidrólisis de aceites vegetales, origina valores de K_m^{ap} y V_{max}^{ap} de la lipasa pancreática porcina, que no se modifican a pesar de que el aceite sea utilizado en frituras. En general, en nuestras condiciones experimentales, la capacidad hidrolítica de la lipasa pancreática *in vitro* no se ve modificada por el diferente grado de alteración de los sustratos.

C.7.- Los resultados obtenidos en la hidrólisis de sustratos mediante la Norma UNE y el método de valoración a pH fijo, no son comparables debido a las diferentes condiciones de ensayo utilizadas en ambos estudios.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- Abousalham, A.; Chaillan, C.; Kerfelec, B.; Foglizzo, E. y Chapus, C. (1992). *Protein Eng.* **5**, 105-111.
- Aitzetmüller, K. (1973a). *J. Chromatogr.* **79**, 329-334.
- Aitzetmüller, K. (1973b). *J. Chromatogr.* **83**, 461-469.
- Aitzetmüller, K. (1988). *Chemistry and Industry*, 452-465.
- Al-Harbi, M. M. y Al-Kahtani, H. A. (1993). *Food Chem.* **48**, 395-401.
- Al-Kahtani, H. A. (1991). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (11), 857-862.
- Aleman-Gomez, J. A.; Colwell, N. C.; Sasser, T. L. y Kumar, V. B. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 964-971.
- Alexander, J. C. (1978). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 711-717.
- Alsina, M. A.; García, M. L.; Espina, M. y Valls, O. (1989). *Colloid Polym. Sci.* **267**, 923-928.
- Ancin Azpilicueta, M. C. y Martínez Ramírez, M. T. (1991). *Grasas y Aceites* **42** (1), 22-31.
- Andrich, G.; Zinnai, A.; Balzini, S.; Silvestri, S.; Fiorentini, R. y Galoppini, C. (1994). *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **71**, 3-9.
- Andrikopoulos, N. K.; Tzamtzis, V. A.; Giannopoulos, G. A.; Kalantzopoulos, G. K. y Demopoulos, C. A. (1989). *Rev. Franç. Corps Gras* **36** (3/4), 127-129.
- Arroyo, R. (1991). **Tesina de Licenciatura**. Universidad Complutense de Madrid.
- Arroyo, R; Cuesta, C.; Garrido-Polonio, M. C.; López-Varela, S. y Sánchez-Muniz, F. J. (1992). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (6), 557-563.
- Artman, N. R. y Alexander, J. C. (1968). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **45**, 643-648.

Bibliografía

- Artom, C. y Reale, L. (1935). *Arch. Sci. Biol. Bologna* 21, 368-380.
- Arzoglou, P. (1994). *Ann. Biol. Clin.* 52, 165-170.
- Augustin, M. A. y Berry, S. K. (1983). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1520-1523.
- Barbe Rocabert, C.; del Pozo Carrascosa, A.; Fauli Trillo, C. y del Pozo Ojeda, A. (1990a). *Industria Farmaceutica* julio/agosto 89-95.
- Barbe Rocabert, C.; del Pozo Carrascosa, A.; Fauli Trillo, C. y del Pozo Ojeda, A. (1990b). *Industria Farmaceutica* sept./octubre 121-132.
- Bardsley, W. G. (1992). *SIMFIT: A Computer Package for Simulation, Curve Fitting and Statistical Analysis in the Life Sciences*. Universidad de Manchester, Reino Unido.
- Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T. y Jörmvall, H. (1986). *Eur. J. Biochem.* 161, 281-288.
- Benkouka, F; Guidoni, A; De Caro, J.; Bonicel, J.; Desnuelle, P. y Röver, M. (1982). *Eur. J. Biochem.* 128, 331-341.
- Benson, J. (1981), en *"Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy"*, Lebenthal, E. ed., Raven Press.
- Benzonana, G. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 151, 137-146.
- Benzonana, G. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 176, 836-848.
- Benzonana, G. y Desnuelle, P. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 164, 47-58.
- Berger, K. G. (1983). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 158-162.
- Berger, K. G. (1987). *Palm Oil Chem. Ind.* 24, 846-851.
- Berger, K. G. y Law, W. S. (1987). *PORIM*, Kuala Lumpur, Malasia.

- Billek, G. (1985), en "*The Role of Fats in Human Nutrition*", Padley, F. B. y Podmore, U. eds., Ellis Horwood, Chichester, 163-161.
- Billek, G. (1992). *Fat Sci. Technol.* **94** (5), 161-172.
- Billek, G.; Guhr, G. y Waibel, J. (1978). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 728-733.
- Block, L. H. (1988), en "*Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*", Lieberman, H. A.; Rieger, M. M.; Banker, G. S. eds., vol. 2, New York, Dekker, 1988, 341.
- Blumenthal, M. M. (1991). *Food Technology* **45** (2), 68-71.
- Blumenthal, M. M. y Stockler, J. R. (1986). *J. Am. Oil Chem. Soc* **63**, 687-688.
- Boelhowver, C.; Knegtel, J. T. y Tels, M. (1967). *Fette Seifen Anstrichm.* **69**, 432-436.
- Borgström, B. y Erlanson, C. (1973). *Eur. J. Biochem.* **37**, 60-68.
- Borgström, B. y Erlanson, C. (1978). *Gastroenterology* **75**, 382-386.
- Bornemann, S; Crout, D. H. G.; Dalton, H. y Hutchinson, D. W. (1992). *Biocatalysis* **5**, 297-303.
- Boskou, D. (1988), en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 174-185.
- Bottino, N. R.; Vandenburg, G. A., y Reiser, R. (1967). *Lipids* **2** (6), 489-493.
- Bourne, Y.; Martínez, C.; Kerfelec, B.; Lombardo, D.; Chapus, C. y Cambillau, C. (1994). *J. Mol. Biol.* **238**, 709-732.
- Bracco, U.; Dieffenbacher, A. y Kolarovic, L. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 6-12.
- Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L. y Menge, U. (1990). *Nature* **343**, 767-770.

Bibliografía

- Brockerhoff, H. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*. **159**, 296-303.
- Brockerhoff, H. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 92-101.
- Brockerhoff, H. (1971). *J. Biol. Chem.* **246** (18), 5828-5831.
- Brockerhoff, H. y Jensen, R. J. (1974) en "*Lipolytic Enzymes*", Academic Press Inc, New York.
- Brockman, H. L. (1984) en "*Lipases*". Borgström, B. y Brockman, H. L. eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1-46.
- Brockman, H. L.; Law, J.H. y Keczdy, F. J. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 4965-4970.
- Brockman, H, L.; Momsen, W. E. y Tsujita, T. (1988). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (6), 891-896.
- Brzozowski, A. M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z. S.; Dodson, G. G.; Lawson, D. M.; Turkenburg, J. P.; Bjorkling, F.; Hunge-Jensen, B.; Patkar, S. A. Thim, L. (1991). *Nature* **231**, 491-494.
- Buck, D. F. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 275-278.
- Bustamante Martínez, P. (1993) en "*Tratado de Farmacia Galénica*". Faulli Trillo, C. ed., Luzán 5, S. A. de Ediciones Madrid, 423-446.
- Castellón Arnau, A. (1989). *Grasas y Aceites* **40** (6), 356-363.
- Chaillan, C.; Kerfelec, B.; Foglizzo, E. y Chapus, C. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 206-211.
- Chan, H. W. S. (1987), en "*Autoxidation of Unsaturated Lipids*", Chan, H. W. S. ed., Academic Press, London, 1-16.
- Chan, H. W. S. y Levett, G. (1977). *Lipids* **12**, 837-840.
- Chang, S. S. y Kummerow, F. A. (1953). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **30**, 403-407.

Bibliografia

- Chang, S. S. y Mone, P. E. (1969), en "*Food Proccesing Rewiew*", nº 5, Bednarcyck, Noyes Development Corporation, New Jersey, 209-211.
- Chang, S. S.; Peterson, R. J. y Ho, C. T. (1978). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 718-727.
- Chapman, G. W., Jr. (1979). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 77-79.
- Chapus, C y Sémériva, M. (1976). *Biochemistry* **15** (23), 4988-4991.
- Chapus, C.; Sari, H.; Sémériva, M. y Desnuelle, P. (1975). *FEBS Lett.* **58**, 155-158.
- Chapus, C.; Sémériva, M.; Bovier-Lapierre, C. y Desnuelle, P. (1976). *Biochemistry* **15**, (23), 4980-4987.
- Chapus, C; Rovey, M., Sarda, L. y Verger, R. (1988). *Biochimie* **70**, 1223-1234.
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G. y Sih, C. J. (1982). *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299.
- Chen, C. S.; Wu, C.H.; Girdaukas, G. y Sih, C. J. (1987). *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 2812-2817.
- Chen, Q.; Sternby, B; Akesson, B. y Nilsson, A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 111-117.
- Christie, W. W. (1987) en "*High-performance Liquid Chromatography and Lipids. A Practical Guide*", Pergamon Press, Oxford (U.K.).
- Christopoulou, C. N. y Perkins, E. G. (1986). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (5), 679-684.
- Christopoulou, C. N. y Perkins, E. G. (1989a). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66** (9), 1344-1352.
- Christopoulou, C. N. y Perkins, E. G. (1989b). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66** (9), 1353-1359.

Bibliografía

- Christopoulou, C. N. y Perkins, E. G. (1989c). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66** (9), 1360-1370.
- Chun, A. H. C.; Joslin, R. S.; Martin, A. N. (1958). *Drug Cosmet. Ind.* **82**, 164-170.
- Clark, S. B.; Brausse, B. y Holt, P. R. (1969). *Gastroenterology* **56**, 214-222.
- Cohen, M.; Morgan, R. G. H. y Hofmann, A. F. (1971). *Gastroenterology* **60**, 1-5.
- Coll Hellin, L. y Rueda Clausell, M. P. (1984). *Anal. Bromatol.* **36**, 33-60.
- Combe, N. (1978). *Rev. Franç. Corps Gras* **25**, 27-28.
- Combe, N.; Constantin, M. J. y Entressangles, B. (1981). *Lipids* **16**, 8-12.
- Constantin, M. J.; Pasero, L. y Desnuelle, P. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 103-109.
- Cottrell, R. C. (1991). *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 989-1009.
- Cowan, J. C. (1961). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **38**, 130-134.
- Coxon, D. T.; Price, K. R. y Chan, H. W. S. (1981). *Chem. Phys. Lipids* **28**, 365-378.
- Coxon, D. T.; Peers, K. E. y Rigby, N. M. (1984). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 67-68.
- Cuesta, C. y Sánchez-Muniz, F. J. (1991). *Alimentación, Equipos y Tecnología* abril, 101-109.
- Cuesta, C. y Sánchez-Muniz, F. J. (1994). *Alimentación, Equipos y Tecnología* abril, 39-43.
- Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F. J. y Hernández, I. (1991a). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (6), 443-445.

Bibliografía

- Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F. J.; Hernández, I. y López-Varela, S. (1991b). *Rev. Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **31** (4), 523-531.
- Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F. J.; Garrido-Polonio, M. C.; López-Varela, S. y Arroyo, R. (1993). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70** (11), 1069-1073.
- Datta, S.; Luo, C-C.; Li, W-H.; Van Tuinen, P.; Ledbetter, D. H.; Brown, M. A.; Chen, S.; Liu, S-H. y Chan, L. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 1107-1110.
- De Caro, J.; Boudouard, M; Bonicel, J.; Guidoni, A.; Desnuelle, P. y Rovey, M. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* **671**, 129-138.
- De Caro, J. D.; Rouimi, P. y Rovey, M. (1986). *Eur. J. Biochem.* **158**, 601-607.
- Deckelbaum, R. J.; Hamilton, J. A.; Moser, A; Bengtsson-Olivecrona, G.; Butbul, E.; Carpentier, Y. A.; Gutman, A. y Olivecrona, T. (1990). *Biochemistry* **29**, 1136-1142.
- Deffense, E. (1985). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 376-385.
- Deleuze, H.; Langrand, G.; Millet, H.; Baratti, J.; Buono, G. y Triantaphyllides, C. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* **911**, 117-120.
- deMan, L. y deMan, J. M. (1994). *Lipid Technol.* enero/febrero, 5-10.
- Derewenda, U.; Brzozowski, A. M.; Lawson, D. M. y Derewenda, Z. S. (1992). *Biochemistry* **31**, 1532-1541.
- Derewenda, U.; Swenson, L.; Wei, Y.; Green, R.; Kobos, P. M.; Joerger, R.; Haas, M. J.; Derewenda, Z. S. (1994). *J. Lipid Res.* **35**, 524-534.
- Desnuelle, P. (1961) en "*Advances in Enzymology (and related subjects of biochemistry)*" vol XXIII. Nord, F. F. ed. Interscience Publishers INC, New York, 129-161.
- Desnuelle, P. (1972) en "*The Enzymes*" 3r ed. vol. VII, Academic Press Inc. P. D. Boyer, 575-614.
- Desnuelle, P.; Sarda, L. y Aihaud, G. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 570-571.

- Deuel, H. J. (1955) en *"The Lipids"* 2, Wiley ed. (Interscience), New York, p. 10.
- Díaz Alonso, A. L. (1977). *Grasas y Aceites* **28**, 2235-241.
- Dobarganes, M. C. y Pérez-Camino, M.C. (1985). *Grasas y Aceites* **36** (3), 186-192.
- Dobarganes, M. C. y Pérez-Camino, M. C. (1988a). *Rev. Franç. Corps. Gras* **35** (2), 67-70.
- Dobarganes, M. C. y Pérez-Camino, M. C. (1988b). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (1), 101-105.
- Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C. y Gutiérrez González-Quijano. (1984a). *Grasas y Aceites* **35** (3), 172-177.
- Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C. y Rios, J. J. (1984b). *Grasas y Aceites* **35** (6), 351-357.
- Dobarganes, M. C.; Rios, J. J. y Pérez-Camino, M. C. (1986). *Grasas y Aceites* **37**, 61-68.
- Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C. y Márquez-Ruiz, G. (1988). *Fat Sci. Technol.* **90**, 308-311.
- Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C. y Márquez-Ruiz, G. (1989). *Grasas y Aceites* **40** (1), 35-38.
- Dooijewaard-Kloosterziel, A. M. P. y Wunters, J. T. M. (1976). *J. Appl. Bacteriol.* **40**, 293-297.
- Dreher, K. D.; Schulman, J. H. y Hofmann, A. F. (1967). *J. Colloid Interface Sci.* **25**, 71-83.
- Dutta, J.; Das, A. K. y Saha, S. (1978). *J. Chromatogr.* **154**, 39-50.
- Edwards-Webb, J. D. (1975). *J. Sci. Food Agric.* **26**, 1943-1948.

- El-Shattory, Y. y Taha, F. S. (1980). *Grasas y Aceites* **31** (1), 23-26.
- Engstrom, J. F.; Rybak, J. J.; Duber, M. y Greenberger, N. J. (1968). *Am. J. Med. Sci.* **256**, 346-351.
- Entressangles, B. y Desnuelle, P. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 285-295.
- Erlanson, C.; Barrowman, J. A. y Borgström, B. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 150-162.
- Erlanson-Albertsson, C. y Larsson, A. (1988). *Biochimie* **70**, 1245-1250.
- Fedeli, E. (1988) en *"Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches"*, Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 52-81.
- Fellat-Zarrouck, K.; Bouteiller, J. C. y Mourin, R. (1988). *Rev. Franç. Corps Gras* **35** (10), 383-385.
- Fersht, A. (1985), en *"Enzyme Structure and Mechanism"*, Freeman, W. H. and Company, New York.
- Figueroa, B. (1984). **Tesina de Licenciatura**. Universidad Complutense de Madrid.
- Firestone, D. (1963). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**, 247-255.
- Firestone, D.; Stier, R. F. y Blumenthal, M. M. (1991). *Food Technology* **45** (2), 90-94.
- Florkin, M. y Stotz, E. H. eds. (1964) en *"Report of the Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry"*, Elsevier, Amsterdam.
- Foote, C. S. (1968). *Acct. Chem. Res.* **1**, 104-110.
- Fournet, B.; Leroy, Y.; Montreuil, J.; De Caro, J.; Rivery, M.; Van Kuik, J. A. y Vliegthart, J. F. G. (1987). *Eur. J. Biochem.* **170**, 363-371.
- Franco, J. M.; Algeciras, J. L.; Trujillo, J. E.; Flores, V. y Gallegos, C. (1994). *Alimentación, Equipos y Tecnología* abril, 61-66.

- Frankel, E. N. (1980). *Prog. Lipid Res.* **19**, 1-22.
- Frankel, E. N. (1982). *Prog. Lipid Res.* **22**, 1-33.
- Frankel, E. N. (1985a). *Prog. Lipid Res.* **23**, 197-221.
- Frankel, E. N. (1985b) en "*Flavour Chemistry of Fats and Oils*", Min, D. B. y Smouse, T. H. eds., AOCS, 1-37.
- Frankel, E. N. (1988) en "*Oxygen Radicals in Biology and Medicine*", Simic, M. G.; Taylor, K. A.; Ward, J. F. y von Sonntag, C eds, Plenum Press, New York, 265-282.
- Frankel, E. N. (1991). *J. Sci. Food Agric.* **54**, 495-511.
- Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Selke, E. y Weisleder, D. (1982). *Lipids* **17**, 11-18.
- Frankel, E. N.; Smith, L. M.; Hamblin, C. L.; Creveling R. K. y Clifford, A. J. (1984). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 87-90.
- Frankel, E. N.; Neff, W. E. y Miyashita, K. (1990). *Lipids* **25**, 40-47.
- Frazer, A. C. y Sammons, H. G. (1945). *Biochem. J.* **39**, 122-128.
- Fritsch, C. W. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 272-274.
- Fritsch, C. W.; Egberg, D. E. y Magnuson, J. S. (1979). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 746-750.
- Frykman, H.; Ohrner, N.; Norin, T. y Hult, K. (1993). *Tetrahedron Lett.* **34** (8), 1367-1370.
- García, M. J.; Rebolledo, F. y Gotor, V. (1992). *Tetrahedron Asymetry* **3** (12), 1519-1522.
- Gardner, H. V. (1989). *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 65-86.

Bibliografía

- Garrido-Polonio, M. C. (1991). *Tesina de Licenciatura*. Universidad Complutense de Madrid.
- Garrido-Polonio, M. C.; Sánchez-Muniz, F. J.; Arroyo, R. y Cuesta, C. (1994). *Z. Ernährungswiss.* **33**, 267-276.
- Gasparoli, A.; Mariani, C. y Fedeli, E. (1986). *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **63**, 383-392.
- Gatt, S.; Barenholz, Y.; Goldberg, R.; Dinur, T.; Besley, G.; Leibovitz Ben-Gershaw, Z.; Rosenthal, J.; Desnick, R. G.; Devine, E. A.; Shafit-Zagardo, B. y Tsuruki, F. (1981) en "*Methods in Enzymology*", Lowenstein, J. M. ed., vol. 72, Academic Press, New York, 351-375.
- George, E. D. (1994). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71** (7), 789-791.
- Gere, A. (1982). *Nahrung* **26** (10), 923-932.
- Gere, A. (1983a). *Fette Seifen Anstrichm.* **85**, 18-23.
- Gere, A. (1983b). *Fette Seifen Anstrichm.* **85**, 111-117.
- Gere, A. (1984). *Rev. Franç. Corps Gras* **31** (11), 437-442.
- Gere, A.; Gertz, Ch. y Morin, O. (1984). *Rev. Franç. Corps Gras* **31**, 341-346.
- Gere, A.; Sebedio, J. L. y Grandgirard, A. (1985). *Fette Seifen Anstrichm.* **87**, 359-362.
- Gertz, C. (1986). *Fette Seifen Anstrichmittel* **88** (12), 475-480.
- Goh, S. H.; Choo, Y. M. y Ong, S. H. (1985). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 237-240.
- Gollnick, K. (1978) en "*Singlet Oxygen*", Ranby, B. Rabek, J. F. eds, John Wiley, New York, 111-134.
- Gomes, T. (1983). *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **60**, 77-80.
- Gordon, M. H. y Magos, P. (1984). *Food Chem.* **10**, 141-147.

- Grandgirard, A. y Julliard, F. (1983). *Rev. Franç. Corps Gras* **30**, 123-128.
- Grandgirard, A.; Sebedio, J. L. y Fleury, J. (1984). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1563-1568.
- Grenner, G.; Deutsch, G.; Schmidtberger, R. y Dati, F. (1982). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **20**, 515-519.
- Grochulski, P.; Yunge, L., Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B. y Cygler, M. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 12843-12847.
- Grochulski, P.; Bouthillier, F.; Kazlauskas, R. J.; Serreqi, A. N.; Schrag, J. D.; Ziomek, E. y Cygler, M. (1994). *Biochemistry* **33**, 3494-3500.
- Grosch, W. (1987), en "*Autoxidation of Unsaturated Lipids*", Chan, H. W. S. ed., Academic Press, London, 95-139.
- Guhr, G. y Waibel, J. (1978). *Fett. Seifen Anstrich.* **80**, 106-113.
- Guillaumin, R. (1973). *Rev. Franç. Corps Gras* **20**, 285-289.
- Guillaumin, R. (1988) en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 82-90.
- Guthrie, H. A.; Picciano, M. F. y Sheeche, D. (1977). *J. Pediatrics* **90**, 39-43.
- Gutiérrez González-Quijano, R. y Dobarganes, M. C. (1988) en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 141-154.
- Guyton, A. C. (1992) en "*Tratado de Fisiología Médica*" 8ª edición, Interamericana de España-Mc Graw Hill.
- Hara, K; Cho, S. Y. y Fujimoto, K. (1989). *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **38** (6), 463-470.

Bibliografía

- Heimermann, W. H.; Holman, R. T.; Gordon, D. T.; Kowalyshyn, D. E. y Jensen, R. G. (1973). *Lipids* **8**, 45-47.
- Helander, H. F. y Olivecrona, T. (1970). *Gastroenterology* **59**, 22-35.
- Henderson, R. J.; Burkow, I. C. y Millar, R. M. (1993). *Lipids* **28** (4), 313-319.
- Hendrick, J. A.; Tadokoro, T.; Emenhiser, C.; Nienaber, U. y Fennema, O. R. (1992). *J. Nutr.* **122**, 269-277.
- Hernáiz, M. J.; Rúa, M.; Celda, B; Medina,; Sinisterra, J.V. y Sánchez-Montero, J. M. (1994a). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **44**, 213-229.
- Hernáiz, M. J.; Sánchez-Montero, J. M. y Sinisterra, J. V. (1994b). *Tetrahedron* **50** (36), 10749-10760.
- Hernández, I. (1989). **Tesina de Licenciatura**. Universidad Complutense de Madrid.
- Hernández, I.; Sánchez-Muniz, F. J. y Cuesta, C. (1989). *Grasas y Aceites* **40** (4-5), 257-263.
- Higuchi, W. I.; Swarbrick, J.; Ho, N. F. H.; Simonelli, P. y Martin, A. (1989) en *"Remington Farmacia"* 17ª ed., Genaro, A. R. ed., Editorial Media Panamericana, Buenos Aires, 423-460.
- Hopia, A. I.; Lampi, A. M.; Piironen, V. I.; Hyvönen, L. E. T. y Koivistoinen, P. E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 779-784.
- Huang, A. S.; Hsieh, A. L.; Huang, C. L. y Chang, S. S. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 997-1001.
- IUPAC. (1987a), *"Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives"*, Paquot, C. y Hautfenne, A. eds., 7ª ed. Método 2301. Intl. Union of Pure and Applied Chemistry Div., Commission on Oil, Fats and Deivatives, Blackwell Scientific, Boston.

Bibliografía

- IUPAC. (1987b), *"Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives"*, Paquot, C. y Hautfenne, A. eds., 7ª ed. Método 2507. Intl. Union of Pure and Applied Chemistry Div., Commission on Oil, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific, Boston.
- Jacobson, G. A. (1991). *Food Technology* 45 (2), 72-74.
- Jensen, R. (1983). *Lipids* 18 (9), 650-657.
- Jensen, O. N. y Moller, J. (1986). *Fette Seifen Anstrichmittel* 88 (9), 352-357.
- Jensen, G. L.; Daggy, B. y Bensadoun, A. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 710, 464-470.
- Junge, W. (1984) en *"Methods of Enzymatic Analysis"*, vol. IV. Bergmeyer, J. y Grabl, M. eds. Verlag Chemie, Weinheim, 15-25.
- Kaanane, A. y Labuza, T. P. (1989), en *"The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition"*, Baynes, I. W. y Monnier, V. M. eds., John Wiley and sons, New York, 301-315.
- Kanasawud, P. y Phutrakul, S. (1993). *Indian Journal of Chemistry* 32 B (1), 88-89.
- Kawase, M.; Sonomoto, K. y Tanaka, A. (1992). *Biocatalysis* 6, 43-50.
- Kazlauskas, R. J. (1994). *TIBTECH* 12, 464-472.
- Kerfelec, B.; Foglizzo, E.; Bonicel, B.; Bougis, P. E. y Chapus, C. (1992). *Eur. J. Biochem.* 206, 279-287.
- Khoo, J. C. y Steinberg, D. (1981) en *"Methods in Enzymology"*. Lowenstein, J. M. ed., vol 71, Academic Press, New York, 627-636.
- Klerkels, J. G. T.; Vleugels, L. F. W.; Geladé, E. T. F.; Vermeulen, D. P.; Kamphuis, J. ; Wandrey, C. y van den Tweel, W. J. J. (1994). *Enzyme Microb. Technol.* 16 (6) , 513-521.
- King, G. y Sibley, I. (1984). *Leatherhead Food Research Association* (LFRA research report no. 462).

Bibliografía

- Kordel, M; Menge, U.; Morelle, G.; Edmann, H. y Schmid, R. D. (1991) en "*Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*". Alberghina, L; Schmid, R. D. y Verger, R. eds., VCH Weinheim, Alemania, 421-424.
- Koseki, M; Tsuji, K; Nakagawa, Y.; Kawamura, M.; Ichikawa, T.; Kazama, M.; Kitabatake, N. y Doi, E. (1989). *Agric. Biol. Chem.* **53** (12), 3127-3132.
- Kupranycz, D. B.; Amer, M. A. y Baker, B. E. (1986). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (3), 332-337.
- Kyoko-Hara, S. C. y Denshiro, F. J. (1989). *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **38**, 463-469.
- Landers, R. E. y Rathmann, D. M. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 255-259.
- Larralde, J. "Fundamentos de Fisiología Animal". Castejón, F.; Fraile, A. y Ponz, F. eds. Ediciones Universidad de Navarra (1979).
- Legier, V.; Del Guist, Ch. Y Comeau, L. (1994). *Rev. Franç. Corps Gras* **41**, 45-52
- Leonard, E. C. (1975) en "*The Dimer Acids*", ed. Humko Sheffield Chemical, Conneticut.
- Lomanno, S. S. y Nawar, W. W. (1982). *J. Food Sci.* **47**, 744-746.
- Lowe, M. E.; Rosenblum, J. L. y Strauss, W. A. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 20042-20048.
- Lumley, I. D. (1988) en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 166-173.
- Macrae, A. R. (1983). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60** (2), 291-294.
- MacFarlane, N; Swetmen, A. A. y Coursey, D. G. (1984). *Palm Oil News* **28**, 11-17.
- Mahé-Gouhier, N. y Léger, C. (1988). *Biochim. Biophys. Acta* **962**, 91-97.
- Mai, J.; Shimp, J.; Weihrauch, J. y Kinsella, J. (1978). *J. Food Sci.* **43**, 1669-1673.

- Marchis-Mouren, G.; Sarda, L y Desnuelle, P. (1959). *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 309-319.
- Márquez-Ruiz, G. (1990). **Tesis Doctoral**. Universidad de Sevilla.
- Márquez-Ruiz, G.; Pérez-Camino, M. C. y Dobarganes, M. C. (1990a). *Grasas y Aceites* **41** (6) 432-439.
- Márquez-Ruiz, G.; Pérez-Camino, M. C. y Dobarganes, M. C. (1990b). *J. Chromatogr.* **514**, 37-44.
- Márquez-Ruiz, G; Pérez-Camino, M. C. y Dobarganes, M. C. (1992a). *Fat. Sci. Technol.* **8**, 307-312.
- Márquez-Ruiz, G; Pérez-Camino, M. C. y Dobarganes, M. C. (1992b). *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **69** (9), 930-934.
- Maylié, M. F.; Charles, M.; Gache, C. y Desnuelle, P. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 286-289.
- Meltzer, J. B.; Frankel, E. N.; Bessler, T. R. y Perkins, E. G. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 779-784.
- Meyer, H. (1979). *Fette Seifen Anstrichm.* **81**, 524-533.
- Miller, L. A. y White, P. J. (1988). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1324-1329.
- Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno. Orden del 26 de Enero de 1989, (B.O.E. número 26, de 31 de Enero de 1989).
- Minzuno, K.; Toyosato, M.; Yabumoto, S.; Tauimizu, I. y Hirakana, H. (1980). *Anal. Biochem.* **108**, 6-10.
- Miyashita, K.; Hara, N.; Fujimoto, K. y Kaneda, T. (1985). *Lipids* **20**, 578-587.
- Miyashita, K.; Takagi, T. and Frankel, E. N. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1045**, 233-238.

Bibliografía

- Mojovic, L.; Siler-Marinkovic, S.; Kukic, G. y Vunjak-Novakovic, G. (1993). *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 438-443.
- Momsen, W. E. y Brockman, H. L. (1976a). *J. Biol. Chem.* **251**, 378-383.
- Momsen, W. E. y Brockman, H. L. (1976b). *J. Biol. Chem.* **251**, 384-388.
- Monferrer, A. y Villalta, J. (1993a). *Alimentación, Equipos y Tecnología* abril, 87-91.
- Monferrer, A. y Villalta, J. (1993b). *Alimentación, Equipos y Tecnología* mayo, 85-90.
- Moreiras-Varela, O.; Ruiz-Roso, B. y Varela, G. (1988), en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 93-102.
- Morrison, W. H. y Robertson, J. A. (1978). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 451-453.
- Morton, J. D. y Alim. H. (1974), en "*Proceedings of the IV Congress Food Science and Technology*", Madrid, vol I, 345.
- Morton, J. D. y Chidley, J. E. (1988) en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 37-51.
- Moskowitz, G. J.; Cassaigne, R.; West, I. R.; Shen, T. y Feldman, L. I. (1977). *J. Agric. Food Chem.* **25**, 1146-1150.
- Mosmuller, E. W. J.; Van Heemst, J. D. H.; Van Delden, C. J.; Franssen, M. C. R. y Engbersen, J. F. J. (1992). *Biocatalysis* **5**, 279-287.
- Mozaffar, Z. y Weete, J. D. (1993). *Lipids* **28** (5), 377-382.
- Mozaffar, Z.; Weete, J. D. y Dute, R. (1994). *J. Am. Oil Chem Soc.* **71** (1), 75-79.
- Muderhwa, J. M.; Brockman, H. (1992). *J. Biol. Chem.* **267** (34), 24184-24192.
- Mustranta, A. (1992). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 61-66.

- Nawar, W. W. (1984). *J. Chem. Educ.* **61**, 299-303.
- Nawar, W. W. (1985a), en "*Chemical changes in food during processing*", Richardson, T. y Finley, J. M. eds., Avi Westport, Connecticut, 79-103.
- Nawar, W. W. (1985b), en "*Flavour Chemistry of Fats and Oils*", Min, D. B. y Smouse, T. H. eds. AOCS Press, 39-60.
- Nawar, W. W.; Bradley, S. J.; Lomanno, S. S.; Richardson, G. G. y Witeaman. (1978), en "*Lipids as a source of flavor*", ed. Am. Chem. Soc., 42-55.
- Neff, W. E.; Frankel, E. N. y Weisleder, D. (1981). *Lipids* **16**, 439-448.
- Neff, W. E.; Frankel, E. N. y Weisleder, D. (1982). *Lipids* **17**, 780-790.
- Neff, W. E.; Frankel, E. N. y Fujimoto, K. (1988). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (4), 616-623.
- Neff, W. E.; Frankel, E. N. y Miyashita, K. (1990). *Lipids* **25**, 33-39.
- Neumann, U.; Kaspar, P. y Ziegenhorn, J. (1984) en "*Methods of Enzymatic Analysis*", vol. IV. Bergmeyer, J. y Grabl, M. eds. Verlag Chemie, Weinheim, 26-34.
- Noble, M. E. M.; Cleasby, A.; Johnson, L. N.; Egmond, M. R. y Frenken, L. G. J. (1993). *FEBS Lett.* **331**, 123-128.
- Nor Aini, I. y Samsuddin, S. (1992). *Palm Oil Developments* **16**, 1-5.
- Nor Aini, I.; Abdullah, A. y Halim, A. H. (1992). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (3), 272-275.
- Norma UNE 55-011. (1964). Instituto Nacional de Normalización (IRANOR). Madrid.
- Norma UNE 55-015. (1958). Instituto Nacional de Normalización (IRANOR). Madrid.
- Norma UNE 55-034. (1964). Instituto Nacional de Normalización (IRANOR). Madrid.

- Norma UNE 55-079-73. (1973). Instituto Nacional de Normalización (IRANOR). Madrid.
- Ooi, C. K.; Choo, Y. M.; Yap, S. C.; Basiron, Y. y Ong, A. S. H. (1994). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71** (4), 423-426.
- Otter, A. M. (1970). *Fette Seifen Anstrichm.* **72**, 667-673.
- Paccalin, J. y Julliet, M. T. (1982). *Medecine Generale*, 109-114.
- Paradis, A. J. y Nawar, W.W. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58** (5), 635-638.
- Pardum, H.; Blass, J. y Kroll, E. (1974). *Fette Seifen Anstrichm.* **75**, 97-104.
- Paul, A. A. y Southgate, D. A. T. (1979), en "*McCance and Widdowson's The Composition of Foods*", 4ª ed., Elsevier, Amsterdam.
- Peers, K. E. y Swoboda, P. A. T. (1979). *J. Sci. Food Agric.* **30**, 876-880.
- Peers, K. E. y Swoboda, P. A. T. (1982). *J. Sci. Food Agric.* **33**, 389-395.
- Peers, K. E.; Coxon, D. T. y Chan, H. W. S. (1981). *J. Sci. Food Agric.* **32**, 898-904.
- Pérez-Camino, M. C. (1986). **Tesis Doctoral**. Universidad de Sevilla.
- Pérez-Camino, M. C.; Márquez-Ruiz, G. y Dobarganes, M. C. (1987). *Grasas y Aceites* **38** (5), 307-312.
- Pérez-Camino, M. C.; Guinda, A.; Márquez-Ruiz, G. y Dobarganes, M. C. (1988a). *Grasas y Aceites* **39** (1), 39-43.
- Pérez-Camino, M. C.; Márquez-Ruiz, G.; Salgado Raposo, A. y Dobarganes, M. C. (1988b). *Grasas y Aceites* **39** (2), 72-76.
- Pérez-Camino, M. C.; Márquez-Ruiz, G.; Ruiz-Mendez, M. V. y Dobarganes, M. C. (1990). *Grasas y Aceites* **41** (4-5), 366-370.
- Perkins, E. G. y Akkeren, V. L. A. (1965). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 782-786.

Bibliografía

- Perkins, E. G. y Pinter, S. (1988). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (5), 783-787.
- Permanyer, J. J. y Boatella, J. (1977). *Anales de Bromatología* **29** (4), 489-496.
- Permanyer, J. J.; Boatella, J. y de la Torre, M. C. (1985). *Grasas y Aceites* **36**, 217-222.
- Perrin, J. L.; Redero, F. y Prévot, A. (1984). *Rev. Franç. Corps Gras* **31**, 131-133.
- Perrin, J. L.; Perfetti, P.; Dimitriades, C. y Naudet, M. (1985). *Rev. Franç. Corps Gras* **32** (4), 151-158.
- Pineda, M. y Cárdenas, J. (1988) en "*Espectroscopia ultravioleta visible de compuestos biológicos*", Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, Córdoba, 17-73.
- Plessis, C. M. y Niekerk, P. J. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 575-578.
- Potteau, B.; Lhuissier, M.; Leclerc, J.; Cuslot, F.; Mezonnet, R. y Cluzan, R. (1970). *Rev. Franç. Corps Gras* **17**, 143-153.
- Pozo Carrascosa del, A. (1993) en "*Tratado de Farmacia Galénica*". Faulli Trillo, C. ed., Luzán 5, S. A. de Ediciones Madrid, 187-196.
- Presidencia del Gobierno (1983). *Real Decreto 308/1983* de 25 de Enero, B.O.E., número 44 de 21 de Febrero de 1983.
- Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. (1980), en "*Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*", Editorial Alhambra S.A., Madrid.
- Privett, O. S. (1959). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **36**, 507-512.
- Pryor, W. A.; Stanley, J. P. y Blair, E. (1976). *Lipids* **11**, 370-379.
- Queraltó Moreno, A.; Olmeda Yuste, S.; Otero Aenlle, E.; Castro Ruiz, R. M. y Vilas Sánchez, V. (1982a). *An. Real Acad. Farm.* **48**, 107-120.

- Queralto Moreno, A.; Nuñez Rodríguez, R.; Otero Aenlle, E.; Castro Ruiz, R. M. y Vilas Sánchez, V. (1982b). *An. Real Acad. Farm.* **48**, 557-568.
- Queralto Moreno, A.; Díez Martín, I.; Castro Ruiz, R. M. y Otero Aenlle, E. (1984). *An. Real Acad. Farm.* **50**, 701-712.
- Rathelot, J.; Canioni, P.; Bosc-bierne, I.; Sarda, L.; Kamoun, R.; Kaptein, R. y Cozzone, P. J. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* **671**, 155-163.
- Reddy, M. N.; Maraganore, J. M.; Meredith, S. C.; Heinrikson, R. L. y Kézdy, F. J. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 9678-9683.
- Robards, K.; Kerr, A. F. y Patsalides, E. (1988). *Analyst* **113**, 213-224.
- Robertson, C. J. (1967). *Food Technology* **21**, 34-36.
- Rodríguez, A.; Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F. J. y Varela, G. (1984). *Grasas y Aceites* **35**, 22-28.
- Rojo, J. A. y Perkins, E. G. (1987). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64** (3), 414-421.
- Rotanova, T. V.; Klaus, R.; Ivanova, A. G.; Ginodinau, L. M. y Antonov, U. K. (1976). *Bioorg. Khim.* **2**, 837-845.
- Roy, R. N. (1980). *J. Appl. Bacteriol.* **49**, 265-271.
- Sagitani, H. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58** (6), 738-743.
- Sakata, M.; Takahashi, Y. y Sonehara, M. (1985). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 449-454.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Hernández, I. y Cuesta, C. (1989). *Grasas y Aceites* **40** (6), 399-405.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Medina, R.; Higón, E. y Viejo, J. M. (1990). *Grasas y Aceites* **41** (3), 256-262.

- Sánchez-Muniz, F. J.; Viejo, J. M. y Medina, R. (1992). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2252-2256.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Cuesta, C. y Garrido-Polonio, M. C. (1993a). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70** (3), 235-239.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Cuesta, C.; López-Varela, S.; Garrido-Polonio, M. C. y Arroyo, R. (1993b) en "*Proceedings of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization*", Applewhite, T. H. ed., AOCS Press, Champaign, 448-452.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Cuesta, C. y Garrido-Polonio, M. C. (1994). *Z. Ernährungswiss.* **33**, 16-23.
- Sánchez-Muniz, F. J.; Cuesta, C.; Garrido-Polonio, M. C. y Arroyo, R. (1995). *Grasas y Aceites*, en prensa.
- Sanelli, B. (1979). *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **56**, 229-234.
- Sarda, L y Desnuelle, P. (1958). *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513-521.
- Saunal, H.; Alvarado, D.; Passet, J. y Delonca, H. (1984). *J. Cosmet. Sci.* **6**, 177-186.
- Savary, P. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **270**, 463-471.
- Schrag, J. D.; Yunge, L.; Wu, S. y Cygler, M. (1991). *Nature* **351**, 761-764.
- Scow, R. O. (1988). *Biochimie* **70**, 1251-1261.
- Sebedio, J. L.; Grandgirard, A.; Septier, C. y Prevost, J. (1987). *Rev. Franç. Corps Gras* **34** (1), 15-18.
- Sebedio, J. L.; LeQuere, J. L.; Morin, O.; Vatele, J. M. y Grandgirard, A. (1989). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66** (5), 704-709.
- Selke, E. y Rohwedder, W. K. (1983). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**, 1853-1858.
- Sémériva, M. y Desnuelle, P. (1979). *Adv. Enzymol.* **48**, 319-370.

- Sémériva, M.; Dufour, C. y Desnuelle, P. (1971). *Biochemistry* **10** (11), 2143-2149.
- Sims, H. F.; Strauss, A. W. y Lowe, M. E. (1992). *Genbank*, M 58369.
- Sims, R. J. y Fioriti, J. A. (1975). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 144-147.
- Sims, R. J.; Fioriti, J. A. y Kanuk, M. J. (1972). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**, 298-301.
- Skagerlind, P. y Jansson, M. (1992). *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **54**, 277-282.
- Smith, L. M.; Clifford, A. J.; Hamblin, C. L. y Creveling, R. K. (1986). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 1017-1023.
- Sonnet, P. E. (1988). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (6), 900-904.
- Sonnet, P. E. y Gazzillo, J. A. (1991). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 11-15.
- Sotirhos, N.; Ho, C. T. y Chang, S. S. (1986). *Fette Seifen Anstrichmittel* **88**, 45-48.
- Stern, S. y Roth, H. (1959). *Cereal Sci. Today* **4**, 176-178.
- Sternby, B.; Engström, A.; Hellman, U.; Vihert, A. M.; Sternby, N. H. y Borgström, B. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **784**, 75-80.
- Stevenson, S. G.; Vaisey-Genser, M. y Eskin, N. A. M. (1984). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61** (6), 1102-1108.
- Sugihara, A.; Shimada, Y. y Tominaga, Y. (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 738-740.
- Sugiura, M. (1984) en "*Lipases*". Borgström, B. y Brockman, H. L. eds., Elsevier, Amsterdam, 505-520.
- Sugiura, M.; Oikawa, T.; Hirano, K. y Inakai, T. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **488**, 353-358.

- Tagiri, M.; Endo, Y.; Fujimoto, K. y Suzuki, T. (1992). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56** (9), 1490-1492.
- Tan, B. K. y Oh, F. C. H. (1981). *PORIM Technol.* **3**, 1-5
- Tanaka, T.; Ono, E.; Ishihara, M.; Yamanaka, S. y Takinami, T. (1981). *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2387-2389.
- Tian, L. L. y White, P. J. (1994a). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71** (10), 1079-1086.
- Tian, L. L. y White, P. J. (1994b). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71** (10), 1087-1094.
- Tietz, N. W. y Repique, E. V. (1973). *Clin. Chem.* **19**, 1268-1276.
- Tietz, N. W.; Astles, J. R. y Shucy, D. F. (1989). *Clin. Chem.* **35**, 1688-1693.
- Thompson, L. V. y Aust, R. (1983). *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* **16**, 246-253.
- Tracy, L. y Gustafson, M. D. (1987). *The Epistat*. Epistat Service.
- Tsuzuki, W. y Suzuki, T. (1991). *Biochim. Biophys. Acta* **1083**, 201-206.
- Uçar, T; Ekiz, H. I. y Caglar, M. A. (1989). *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1213-1218.
- Van Autryve, P.; Ratomahenina, R.; Riaublanc, A.; Mitrani, C.; Pina, M.; Graille, J. y Galzy, P. (1991). *Oleagineux* **46** (1), 29-31.
- van Tilbeurgh, H.; Sarda, L.; Verger, R. Y Cambillau, C. (1992). *Nature* **359**, 159-162.
- van Tilbeurgh, H.; Egloff, M. P.; Martínez, C.; Rugani, N.; Verger, R. y Cambillau, C. (1993). *Nature* **362**, 814-819.
- Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M. C.; Rathé, J. y Christophe, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **370**, 257-268.
- Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M. C.; Rathé, S. y Christophe, J. (1975). *FEBS Lett.* **49**, 334-337.

- Varela, G. (1977). *Bibliotheca Nutritio et Dieta* **25**, 112-121.
- Varela, G. y Mataix, J. "Fundamentos de Fisiología Animal". Castejón, F.; Fraile, A. y Ponz, F. eds. Ediciones Universidad de Navarra (1979).
- Varela, G.(1988) en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. eds, Ellis Horwood, Chichester, England, 9-25.
- Varela, G.; Moreiras-Varela, O. y Ruiz-Roso, B. (1983). *Grasas y Aceites* **34**, 101-107.
- Varela, G.; Bender, A. E. y Morton, I. D. (eds.) (1988), en "*Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches*", Ellis Horwood, Chichester, England, 1-202.
- Veeraragavan, K. (1990). *Analytical Biochemistry* **186**, 301-305.
- Verger, R. (1984) en "*Lipases*". Borgström, B. y Brockman, H. L. eds., Elseiver, Amsterdam, 83-150.
- Verger, R. y de Hass, G. H. (1976). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **5**, 77-117.
- Verger, R.; de Haas, G. H.; Sarda, L. y Desnuelle, P. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **188**, 272-282.
- Verger, R.; van Tilbeurgh, R.; Ferrato, F.; Rogalska, E.; Aoubala, M.; de Caro, A.; Ivanova, M.; de la Fournière, L.; Rivière, C.; Sarda, L. y Cambillau, C. (1994). *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*. Alberghina, L; Frontali, L. y Sensi, P. eds. Elseiver Science B. V. 121-128.
- Vic, G. (1990). *Biofutur* marzo, 51-55.
- Waller, G. R.; Beckel, R. W. y Adeleye, B. O. (1983), en "*The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*", Waller, G. R. y Feather, M. S. eds., ACS Symp. Am. Chem. Soc., Washington D. C., 125-127.
- Waliking, A. E. (1975). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**, 898-901.
- Waliking, A. E. y Zmachinski, H. (1970). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **47**, 330-334.

- Walting, A. E. y Wessels, H. (1981). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 1329-1330.
- White, P. J. (1991). *Food Technol.* **45** (2), 75-80.
- White, P. J. y Wang, Y. C. (1986). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (7), 914-920.
- Wilcox, R. W. ; Thuren, T.; Sisson, T.; Schmitt, J. D.; Kennedy, M. y Waite, M. (1993). *Biochemistry* **32**, 5752-5758.
- Wilton, D. C. (1990). *Biochem. J.* **266**, 435-439.
- Wills, E. D. (1965). *Advan. Lipid. Res.* **3**, 197-240.
- Winkler, F. K.; D'Arcy, A. y Hunziker, W. (1990). *Nature* **343**, 771-774.
- Woo, A. H. y Lindsay, R. C. (1980). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 414-416.
- Yamanane, S. y Mase, T. (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 720-725.
- Yang, L. Y.; Kuksis, A. y Myher, J. J. (1990). *J. Lipid Res.* **31**, 137-147.
- Yoon, S. H.; Kim, S. K.; Kim, K. H; Kwon, T. W. y Teah, Y. K. (1987). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64** (6), 870-873.
- Yoshida, H. y Alexander, J. C. (1983). *Lipids* **18** (6), 402-407.
- Zaks, A. y Klivanov, A. M. (1984). *Science* **224**, 1249-1251.
- Zaks, A. y Klivanov, A. M. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3192-3196.
- Zhu, J. y Sevilla, M. D. (1990). *J. Phys. Chem.* **94**, 1447-1452.